





---

# Therapeutische Angiogenese durch Kotransfektion von VEGF-A und PDGF-B bei chronischer myokardialer Ischämie am Schweineherz

Alexander Wuchrer

---



München 2012



Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

---

# Therapeutische Angiogenese durch Kotransfektion von VEGF-A und PDGF-B bei chronischer myokardialer Ischämie am Schweineherz

Alexander Wuchrer

---

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
zu München

vorgelegt von  
Alexander Wuchrer  
aus Chemnitz

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Zweitgutachter:

Prof. Dr. med. Wolfgang Siess

Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

Mitbetreuung durch

die promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. vet. Rabea Hinkel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die koronare Herzerkrankung . . . . .	1
1.2	Die Physiologie des Gefäßwachstums . . . . .	2
1.3	Die therapeutische Angiogenese . . . . .	3
1.3.1	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) . . . . .	4
1.3.2	Platelet Derived Growth Factor (PDGF) . . . . .	6
1.3.3	Der Genvektor . . . . .	7
1.3.4	Applikationswege . . . . .	11
1.4	Fragestellungen . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Versuchstiere und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Versuchstiere . . . . .	13
2.2	Geräte und Pharmaka . . . . .	13
2.3	Versuchsablauf . . . . .	17
2.4	Hard- und Software . . . . .	18
2.5	Methoden . . . . .	19
2.5.1	Die selektive druckregulierte Retroinfusion . . . . .	19
2.5.2	Die regionale myokardiale Perfusion . . . . .	21
2.5.3	Die globale Myokardfunktion . . . . .	22
2.5.4	Die regionale myokardiale Funktion . . . . .	23
2.5.5	Die Färbung des ischämischen Gewebes . . . . .	24
2.5.6	Virusproduktion . . . . .	24
2.5.7	Nachweis des Gentransfers . . . . .	25
2.5.8	Kapillardichte . . . . .	26
2.6	Statistik . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Nachweis des Gentransfers . . . . .	29
3.2	Kapillardichte . . . . .	33
3.3	Kollateralgefäße . . . . .	33
3.4	Die regionale myokardiale Perfusion . . . . .	33
3.5	Die globale myokardiale Funktion . . . . .	38
3.6	Die regionale myokardiale Funktion . . . . .	40

<b>4 Diskussion</b>	<b>45</b>
4.1 Tierexperimentelles Modell . . . . .	45
4.2 Nachweis des Gentransfers . . . . .	46
4.3 Angiogenese . . . . .	48
4.4 Arteriogenese und Maturation . . . . .	50
4.5 Die regionale myokardiale Perfusion . . . . .	52
4.6 Die myokardiale Funktion . . . . .	52
4.7 Fazit . . . . .	54
<b>Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>Danksagung</b>	<b>86</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Die koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern (WHO, 2008). Allein in Deutschland starben im Jahr 2007 über 130000 Menschen an KHK (Bundesamt, 2009). Sie wird durch atherosklerotische Veränderungen in den Koronararterien verursacht. Diese werden wiederum durch Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, familiäre Vorbelastung, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie und Diabetes Mellitus begünstigt (Assmann et al., 2002; Fruchart et al., 2004). Wenn das Lumen einer Koronararterie um 50-70 % eingeengt ist, kann die Arterie sich nicht mehr ausreichend erweitern, um den gesteigerten Blutfluss bei Belastung sicher zu stellen. Ist das Lumen schon um 80-90 % eingeengt, kann sie ihn auch nicht mehr bei Ruhe sicher stellen (Uren et al., 1994). Als Reaktion darauf stellen sich die distal liegenden kleineren Arteriolen weit. Reicht diese Gegenregulation nicht mehr aus, kommt es zu einer Minderperfusion des zu versorgenden Gewebes. Diese führt intrazellulär zu einem pH-Abfall, dem Verlust von energiereichen Phosphatverbindungen und Kalium sowie zu einem Anstieg von Natrium und Kalzium. Durch diese Veränderungen kommt es zu Störungen der Mechanik und der Elektrophysiologie. Bei fehlender Intervention durch die perkutane transluminale

Koronarangioplastie (PTCA) oder die Bypasschirurgie (CABG) führt eine chronische myokardiale Ischämie oft zur Fibrosierung, zu einem Verlust der Pumpfunktion und letztendlich zu einer Herzinsuffizienz. Bis zu 12% der Patienten sind auf Grund von diffuser KHK, kleinen distalen Gefäßen und anderen Begleiterkrankungen weder durch die PTCA noch durch die CABG oder medikamentös therapierbar ("no-option Patienten") (Mukherjee et al., 1999). Für diese Gruppe müssen neue Behandlungsmöglichkeiten gefunden werden, wie zum Beispiel die therapeutische Angiogenese (Isner, 2002).

## 1.2 Die Physiologie des Gefäßwachstums

Beim Gefäßwachstum können drei unterschiedliche Vorgänge beobachtet werden. Diese werden als Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese bezeichnet (Kupatt, 2007).

Vaskulogenese bezeichnet das de-novo-Entstehen neuer Gefäße durch Endothel-Vorläuferzellen. Lange Zeit wurde angenommen, dass dies nur in der Embryonalzeit möglich sei. Mittlerweile wird die Vaskulogenese jedoch auch in adulten Organismen angenommen. (Kumar und Caplice, 2010), auch wenn die Rolle der Vorläuferzellen nicht in allen Details geklärt ist. Unter dem Begriff Angiogenese versteht man das Entstehen neuer Kapillaren durch Aussprossung aus einem bereits vorhandenen Kapillarnetz (Simons et al., 2000). Dies wird unter anderem durch Aktivierung des „hypoxia inducible factor“ (HIF-1 $\alpha$ ) und die nachfolgende Transkription von Wachstumsfaktoren verursacht (Schaper und Buschmann, 1999). Sie kann aber auch durch eine lokale Freisetzung von vaskulären Wachstumsfaktoren ausgelöst werden, zum Beispiel bei einer Entzündung (Rajashekhar et al., 2006). Das Wachstum von kleinen Gefäßen während der Angiogenese lässt sich in zwei Schritte einteilen. Zuerst bildet sich durch das Wachstum und die Wanderung von Endothelzellen eine zylinderähnliche Struktur aus. Dies geschieht entlang der Gradienten der Angiogenesefaktoren. Im Anschluss wird das Gefäß durch Perizyten stabilisiert (Gerhardt et al., 2003; Dor et al., 2002; Jain, 2003). Die Arteriogenese, also die Ausbildung von

Gefäßen mit einer relevanten glatten Muskulatur, ist ganz entscheidend für die Entstehung von Kollateralen. Man weiß seit Jahrzehnten, dass am Herzen ein angelegtes Kollateralnetz besteht. Aus diesem können bei einer Stenose einer Koronararterie große Arterien und eine suffiziente Kollateralendurchblutung entstehen. Spätere Versuche haben einen ergänzenden Einfluss von zirkulierenden Zellen, insbesondere Monozyten, gezeigt. Diese infiltrieren die Wände der wachsenden Gefäße und setzen Wachstumsfaktoren frei, die für die Reifung zu Arterien wichtig sind (van Royen et al., 2009) Abb. 3.7.

## **1.3 Die therapeutische Angiogenese**

Das Endothel eines Erwachsenen befindet sich normalerweise in einem Ruhezustand und das Gefäßnetz vergrößert sich nur in Folge von Stress, wie zum Beispiel bei Hypoxie. Die Gefäßneubildung ist ein komplexer Vorgang und es sind viele Faktoren dafür notwendig (Luttun und Carmeliet, 2003). Darunter sind lösliche Peptide wie „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF), die Angiopoetine, die „fibroblast growth factors“ (FGF), die „platelet derived growth factors“ (PDGF), der „transforming growth factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ), der „tumor necrosis factor- $\alpha$ “ (TNF- $\alpha$ ), die „colony stimulating factors“ und andere (Papetti und Herman, 2002). Aber auch membranständige Proteine wie zum Beispiel Integrine, Cadherine, Syndecane, Ephrine und auch mechanische Kräfte spielen eine Rolle (Annex und Simons, 2005). Obwohl es durch diese physiologischen Vorgänge zu einer Vergrößerung des Gefäßnetzes kommt, reicht diese oft nicht aus, um die Ischämie zu beheben. Hier setzt die therapeutische Angiogenese an, die durch die Gabe von angiogenetischen Wachstumsfaktoren oder derer Gene versucht, das ischämische Gewebe zu retten (Kupatt, 2007).

### 1.3.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Bei der Angiogenese spielt VEGF eine wichtige Rolle (Ylä-Herttuala et al., 2007). Die Expression dieses Wachstumsfaktors reagiert sehr sensibel auf den lokalen Sauerstoffgehalt im Gewebe. Unter anderem wird hypoxisch der „hypoxia inducible factor“ (HIF-1 $\alpha$ ) reguliert (Ferrara et al., 2003).

Die Liganden des VEGF-Systems sind eine Familie von Glykoproteinen mit sechs Mitgliedern (VEGF-A bis E und dem „placental growth factor“ (PlGF)), aus denen durch alternatives Spleißen einer Vorläufer mRNA noch eine Vielzahl von Isoformen transkribiert werden (Freedman und Isner, 2002). VEGF-A wurde zuerst als ein Induktor der Durchlässigkeit von Tumorgefäßen beschrieben (Senger et al., 1983) und wurde in den letzten dreißig Jahren intensiv erforscht. Es existieren für VEGF-A Isoformen mit 121, 145, 165, 183, 189, und 206 Aminosäuren, wobei sich diese in ihrem Bindungsverhalten und dadurch in ihrem Effekt unterscheiden (Harper und Bates, 2008). VEGF<sub>165</sub> ist die häufigste humane Isoform (Dvorak et al., 1995) und kürzlich wurde eine neue Variante entdeckt, VEGF<sub>165b</sub>. Diese hat am C-Terminus sechs abweichende Aminosäurereste (Harper und Bates, 2008). Es wurden für diese Isoform interessanterweise anti-angiogenetische Effekte beschrieben (Bates et al., 2002; Perrin et al., 2005). Die leichteste Isoform, VEGF<sub>121</sub> kann frei diffundieren, wohingegen die schwereren Isoformen an Heparansulfat-Proteoglykan auf der Zellmembran und im Extrazellulärraum binden.

Die VEGF-Liganden binden als Dimere an Tyrosinkinaserzeptoren und aktivieren dadurch die entsprechenden Signalkaskaden. Bisher sind drei strukturell verwandte Rezeptoren beschrieben worden, VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1) und VEGFR3 (Flt-4). Die extrazellulären Anteile von VEGFR1 und VEGFR2 bestehen aus sieben immunglobulin-ähnlichen Domänen, wohingegen die fünfte Domäne in VEGFR2 durch Disulfidbrücken ersetzt wird. Alle drei Rezeptoren haben eine transmembranöse Domäne, zwei Kinase Domänen, die durch eine Kinase Insert Domäne geteilt wird, und ein C-terminales Ende. Durch die Bindung von Rezeptor und Ligand, kommt es zu Homo- und Heterodimerisation der Rezeptoren und nachfolgender Aktivierung der

Tyrosinkinase (Dixelius et al., 2003; Olsson et al., 2006). An den Rezeptor VEGFR1 binden die Liganden VEGF-A, VEGF-B und PlGF. An VEGFR2 bindet normalerweise nur VEGF-A, jedoch können auch proteolysierte VEGFC und VEGFD binden (Holmes et al., 2007). An VEGFR3 binden VEGFC und VEGFD.

Durch das VEGF-System wird einerseits eine Vielzahl von biologischen Prozessen reguliert. VEGFR1 und VEGFR2 sind wichtig für die Signale der Angiogenese, VEGFR3 für die Lymphangiogenese (Papetti und Herman, 2002). VEGFR1 scheint, wenn VEGF-A bindet, einen hemmenden Einfluss auf das Gefäßwachstum zu haben (Ambati et al., 2007). VEGFR2 ist für die Steigerung der Angiogenese der wichtigste Rezeptor dieser Gruppe (Wu et al., 2010). Biologische Mechanismen steuern die Aktivität von VEGF. Je nach den lokalen Anforderungen an die Angiogenese werden die Rezeptoren und die Liganden unterschiedlich exprimiert. Einerseits wird durch Hypoxie, die häufig während der Embryogenese und bei großen Tumoren beobachtet werden kann, die Expression sowohl von VEGFR (Ezhilarasan et al., 2007; Gerber et al., 1997; Nilsson et al., 2004), als auch von VEGF-A (Pugh und Ratcliffe, 2003) hochreguliert. Andererseits wird durch den Notch-Signalweg die Expression von VEGFR1 erhöht, jedoch die von VEGFR2 vermindert (Suchting et al., 2007). Neben der unterschiedlichen Expression von Ligand und Rezeptor führen auch die diversen Isoformen, mit ihren unterschiedlichen Bindungsfähigkeiten an den Co-Rezeptor Neuropilin und Heparansulfat-Proteoglykan, zu Unterschieden bei der Bindung an die VEGF-Rezeptoren. Ein gutes Beispiel hierfür ist VEGF<sub>165b</sub>, welches nicht an Neuropilin-1 binden kann (Kawamura et al., 2008) und nur schlecht an Heparansulfat-Proteoglykan bindet (Suarez et al., 2006). Die Bindung von VEGF-A an Heparansulfat-Proteoglykan ist für eine starke und lange Signaltransduktion an VEGFR2 wichtig (Jakobsson et al., 2006). Es wurden auch Varianten von VEGFR2 beschrieben, die durch Proteolyse entstanden sind (Ebos et al., 2004; Kendall und Thomas, 1993). Da VEGFR1 eine höhere Bindungsaffinität hat als VEGFR2, kann VEGFR1 durch eine kompetitive Hemmung mit VEGF-A die Signalkaskade von VEGFR2 negativ regulieren (Hiratsuka et al., 1998). Für unterschiedliche Tyrosinphosphatasen, zum Beispiel

die T-Zell Protein Tyrosin Phosphatase (TCPTP) und die "Density-Enhance PTP 1"(DEP-1), konnte gezeigt werden, dass sie durch Dephosphorylierung die Aktivität von VEGFR2 hemmen (Lampugnani et al., 2003; Mattila et al., 2008).

### 1.3.2 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

PDGF spielt bei der Reifung von Gefäßen (Betsholtz, 2004), aber auch bei der Neovaskularisation im embryonalen und adulten Gewebe (Hao et al., 2004) eine große Rolle. PDGF ist ein hydrophiles und hitzestabiles Protein. Es wird von einer Vielzahl von Zellen produziert, darunter sind Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Gliazellen, Astrozyten, Myoblasten, Glatte Muskelzellen und Tumorzellen. Der größte Teil wird aber in den Megakaryozyten gebildet, dort wird es in Granula gespeichert und bei Aktivierung der Zellen ausgeschüttet (Betsholtz et al., 2001). PDGF ist der Familie der VEGF genetisch und strukturell nah verwandt. Beim Säugetier kodieren neun Gene für vier PDGF- und fünf VEGF-Ketten. Diese PDGF-Ketten (PDGF-A bis PDGF-D) bilden Dimere, wobei in vivo hauptsächlich die homodimeren Formen PDGF-AA und PDGF-BB vorkommen. Diese Isoformen binden mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren (Fredriksson et al., 2004). Die PDGF-Rezeptoren werden ebenfalls von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, darunter sind Fibroblasten, Osteoblasten, Chondroblasten, Glatte Muskelzellen, Gliazellen und Endothelzellen (Heldin und Westermark, 1999). Es wurden bisher zwei Rezeptoren beschrieben, PDGFR- $\alpha$  und - $\beta$  (Claesson-Welsh et al., 1991). PDGFR- $\alpha$  ist in der Lage mit den Liganden PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB eine Verbindung einzugehen, wohingegen PDGFR- $\beta$  nur mit PDGF-BB und PDGF-AB bindet (Heldin und Westermark, 1990; Heldin et al., 1992). Nach dem Binden kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors mit einer anderen  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Einheit (Bishayee et al., 1989). PDGF bindet auch an extrazelluläre Proteine, wodurch zum Beispiel, über die Interaktion mit bFGF, die Expression von PDGFR- $\alpha$  lokal gesteigert wird (Brogi et al., 1994).

Durch PDGF werden die Expression der PDGF-Rezeptoren, einiger anderer Membranrezeptoren und verschiedener Zytokine gesteuert. PDGF fungiert als chemotaktischer Faktor für Fibroblasten, hämatopoetische Zellen, Mesenchymzellen, Monozyten, Neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten (Daynes et al., 1991)). Es wurde eine Interaktion von PDGF mit VEGF beschrieben. Hierbei kommt es über den PDGFR- $\beta$  zu einer Steigerung der Expression von VEGF (Brogi et al., 1994; Siegbahn et al., 1990). Während der Bildung von Kapillaren wandern PDGFR- $\beta$  tragende Perizyten, durch Chemotaxis gesteuert, zur neu entstehenden Kapillare (Gerhardt et al., 2003). Perizyten kommen zwischen dem Parenchym und dem Gefäß vor. Sie regulieren durch parakrine Signale das Endothel im Sinne der vaskulären Homöostase (Gerhardt und Betsholtz, 2003; Hirschi et al., 1999). In „knock out“ Studien konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von PDGF-B oder PDGFR- $\beta$  zu Mikroaneurysmen und zum Tod kurz nach der Geburt führt (Hellström et al., 1999; Lindahl et al., 1997; Hellström et al., 2001).

In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die postischämische Applikation von PDGF-CC zu einer gesteigerten Umwandlung von Endothelvorläuferzellen zu Endothel- und glatten Muskelzellen führte und dadurch zu einer besseren Revaskularisation am Herzen und am Hinterlauf führte (Li et al., 2005).

Die Kombination aus VEGF-A und PDGF-BB wurde bereits in einem Modell eines akuten Herzinfarkts an Ratten erprobt. Dabei wurden hämatopoetische Stammzellen mit einer Überexpression dieser beiden Proteine appliziert. Dabei kam es neben einer Neovaskularisation auch zu einer verbesserten Herzfunktion (Das et al., 2009).

### **1.3.3 Der Genvektor**

Der ideale Vektor sollte nicht zytotoxisch, hoch effizient und nicht immunogen sein. Außerdem sollte er einen Gewebetropismus und eine große Kapazität haben. Neben der Nutzung von Plasmiden, Polymeren und der Elektroporation stellen virale Vektoren eine elegante und vielversprechende Möglichkeit dar, Gene zu transfizieren (Gaffney et al., 2007). Bei einer viralen

Gentherapie werden die Viren gezielt verändert um das gewünschte genetische Material in vivo oder auch in vitro in die Empfängerzelle einzuschleusen. Dieser Vorgang wird auch als Transduktion bezeichnet und ist eine etablierte Methode in Industrie und Forschung (Knippers, 2006; Enquist et al., 2003).

Retroviren gehören zu den ersten Vektoren, die für die Gentherapie an Gefäßen genutzt wurden (Nabel et al., 1990). Es sind RNA-Viren, die ihre RNA in das Genom des Empfängers integrieren. Das führt zu einer lang anhaltenden Expression aber auch zur Insertionsmutagenese (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Woods et al., 2006). Außerdem integrieren sie nur in Zellen, die sich gerade teilen.

Lentiviren sind für den Gentransport modifizierte HIV-Viren und enthalten einzelsträngige RNA. Sie haben eine Kapazität von ungefähr 8 kb und integrieren sich durch ihre Reverse Transkriptase in das Wirtsgenom. Lentiviren haben den Vorteil sich sowohl in teilende als auch in nicht teilende Zellen zu integrieren, was sie für die Verwendung am Myokard interessant macht. In den bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass es bei Lentiviren zu keiner relevanten Immunreaktion kommt und sie insgesamt zu einer stabilen Langzeitexpression führen. Jedoch besteht die Gefahr von Insertionsmutagenesen, was in der Anfangszeit der Gentherapie mit Lentiviren zu einer gesteigerten Zahl von Leukämien führte (Mikkers und Berns, 2003). Um das Risiko von Insertionsmutagenesen zu minimieren versuchen neuere Entwicklungen z.B. mit selbstabschaltende LTRs das Risiko zu vermindern (Montini et al., 2009), jedoch ist das Problem noch nicht völlig gelöst.

Adenoviren sind die in der kardiovaskulären Gentherapie am häufigsten eingesetzten Vektoren. Sie besitzen Doppelstrang-DNA und bieten eine hohe Kapazität für das Zielgen (35kb). Adenoviren können wie die Lentiviren auch nichtteilende Zellen transfizieren, was sie besonders geeignet für den Einsatz am Herzen macht. Im Gegensatz zu den Retroviren integrieren sich Adenoviren nicht in das Wirtsgenom, sondern verbleiben episomal. Dies reduziert das Risiko einer



Tumorentstehung enorm. Adenoviren führen zu einer frühzeitigen Expression des gewünschten Gens, allerdings kommt es zu einer starken Immunantwort, die eine wiederholte Applikation gefährlich macht. Diese Immunantwort ist bei Adenoviren aktuell noch ein Problem (Hinkel et al., 2011).

Adeno-assoziierte-Viren (AAV) sind einzelsträngige DNA Viren mit ikosaedrischem Kapsid aus der Gruppe der Parvoviren (Muzyczka, 1992; Palomeque et al., 2007). Der Wildtyp ist im Genom der meisten Menschen zu finden, ist aber nach heutigen Kenntnissen nicht pathogen (Jayandharan et al., 2008; Mueller und Flotte, 2008). AAV sind mit einem Molekulargewicht von  $5,5 \cdot 10^6$  bis  $6,2 \cdot 10^6$  Dalton die kleinsten bis heute bekannten eukaryotischen DNA Viren (Lu, 2004). Der Lebenszyklus des Wildtyp-AAV kann in zwei Phasen aufgeteilt werden. In der ersten Phase wird das Virus in die Empfängerzelle aufgenommen und in das Wirtsgenom integriert. Dies geschieht beim Menschen bevorzugt am Chromosom 19 in Position 19q-13.4qter (Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991; Weitzman et al., 1994). Allerdings findet dieser Schritt in neueren Generationen des AAV nicht mehr statt. Die zweite Phase setzt die gleichzeitige Infektion mit Helferviren (Adeno, Herpes-Simplex, Papilloma, HHV6, CMV) voraus (Palomeque et al., 2007; Muzyczka, 1992; Berns und Giraud, 1996), daher werden AAV auch der Untergruppe der Dependoviren zugeordnet. Diese Helferviren tragen Gene bei, die die Genexpression regulieren und für virale DNA Polymerasen oder Helikasen kodieren (Berns und Giraud, 1996). Dadurch kann die Replikation der AAV stattfinden. Momentan sind über 120 Varianten des AAV bekannt (Palomeque et al., 2007; Gao et al., 2002).

AAV haben gegenüber anderen Vektoren einige Vorteile. So können Zellen sowohl in vivo, als auch in vitro transduziert werden und das unabhängig davon, ob sie sich gerade in der Zellteilung befinden (A. L. Baert, 2006). Ein weiterer Vorteil besteht in der effizienten und langfristigen Expression des genetischen Materials, kombiniert mit einem geringen Risiko für Mutationen durch Insertion in das Empfänger-genom (McCarty et al., 2001; Pacak et al., 2006; Gao et al., 2006; Danos, 2008; Fechner et al., 2008). Außerdem lassen sich AAV-Vektoren einfach und in großer

Menge produzieren, sie sind gewebspezifisch und lösen nur eine minimale Immunantwort aus (Lu, 2004). Am Tiermodell konnten in diversen Studien gute Ergebnisse erzielt werden (Acland et al., 2001; Wang et al., 2002; De et al., 2004; Raake et al., 2008). Auch beim Menschen wurde AAV im Rahmen von Gentherapiestudien bei Hämophilie-B, Morbus Parkinson und Zystischer Fibrose eingesetzt (Kay et al., 2000; Manno et al., 2003; Carter, 2005; Warrington und Herzog, 2006; Mueller und Flotte, 2008; Fiandaca et al., 2008).

Es gibt beim AAV aber auch gewisse Nachteile. So beträgt die Aufnahmekapazität für genetisches Material nur 4,7 kbp (Lu, 2004). Um diese Begrenzung zu umgehen sind Strategien wie zum Beispiel die Heterodimerisation entwickelt worden (Sun et al., 2000; Yan et al., 2000; Nakai et al., 2005; Duan et al., 2001). Häufig besteht eine Immunität gegen den Wildtyp-AAV, was die Einsetzbarkeit von AAV als Vektoren einschränkt (Palomeque et al., 2007; Mueller und Flotte, 2008).

Die einzelnen AAV-Serotypen unterscheiden sich durch die Aminosäuresequenz der Kapsidproteine. Das kann für einen gezielten Einsatz auf bestimmten Oberflächenproteinen genutzt werden. Am häufigsten war bisher der Einsatz von AAV-2 (Muzyczka, 1992; Mueller und Flotte, 2008; Rabinowitz und Samulski, 2000). Dieser wurde verstärkt für die Untersuchung und Therapie kardialer Dysfunktionen benutzt (Palomeque et al., 2007). Ein anderer Serotyp, der für die kardiale Transduktion geeignet erscheint, ist AAV-9 (Mueller und Flotte, 2008; McCarty et al., 2001; Inagaki et al., 2006; Sarkar et al., 2006). In der Arbeit von Miyagi et al. wurde an Rattenherzen in vitro AAV-9 in verschiedenen Dosierungen appliziert. Mit der höchsten Dosis von  $2 \times 10^{12}$  Viruspartikeln konnte eine myokardiale Transduktion von 74 % erreicht werden. Die Transduktion war über einen Zeitraum von drei Monaten stabil, und es konnte keine Transduktion an anderen Organen nachgewiesen werden (Miyagi et al., 2008). Eine in vivo Studie an Primaten von Pacak et al. konnte ebenfalls einen deutlichen kardialen Gewebetropismus von AAV-9 zeigen. Der Vektor konnte bei systemischer Gabe in das adulte Myokard effizient transduzieren und es traten keine Nebenwirkungen im transduzierten Gewebe auf (Pacak et al., 2006).

Eine Möglichkeit die Vor- und Nachteile der einzelnen AAV-Serotypen neu zu verteilen, stellt die Rekombination von Anteilen dieser Serotypen dar (Du et al., 2004). Dadurch lässt sich zum Beispiel der Nachteil, dass man bei AAV2 kein Heparin geben kann, rückgängig gemacht. Wir entschieden uns für eine Kombination aus AAV2 und AAV9, den Pseudotyp 2/9. Dabei ist der Anteil des AAV2 für die Transduktion des gewünschten Gens und der Teil mit AAV9, aufgrund dessen hohen kardiale Affinität, für den Gewebetropismus zuständig. Für diesen Pseudotyp AAV2/9 wurde eine sehr effektive kardiale Transduktion beschrieben (Pacak et al., 2006).

### **1.3.4 Applikationswege**

Da bei atherosklerotischen Koronararterien der antegrade Weg ineffektiv ist (Markkanen et al., 2005; Feldman und Steg, 1997; Steg et al., 1994; Hatori et al., 1991; Miyazaki et al., 1990) wurden andere Wege zur Applikation von Substanzen in das Herz gesucht, darunter die direkte intramyokardiale Injektion, die perkutane intramyokardiale Injektion und auch die Retroinfusion über die Koronarvenen (Szelid et al., 2010; Hinkel et al., 2008; Raake et al., 2004; Rothmann et al., 1996; French et al., 1994a,b).

Die ersten perkutanen Retroperfusionen wurden mit Ballonkathetern in den Sinus Coronarius durchgeführt (Mohl et al., 1984; Meerbaum et al., 1976). 1990 wurde die Retroinfusion mit selektiver Absaugung entwickelt (Boekstegers et al., 1994, 1990) und 1991 kam die Methode der Elektrokardiogramm-gesteuerten diastolischen Retroperfusion auf (Costantini et al., 1991; Kar et al., 1991; O'Byrne et al., 1991). 1992 wurden erste Experimente zur Druck-Fluss Beziehung während der Retroinfusion durchgeführt (Oh et al., 1992). Der nächste Schritt war, den Infusionsdruck an den individuellen Druck im koronarvenösen System anzupassen, die selektive druckregulierte Retroinfusion (von Degenfeld et al., 1997). Diese Methode zeigte auch in klinischen Studien Erfolge (Pohl et al., 2004; Boekstegers et al., 1998). Die Applikation von Genen mit der druckregulierten Retroinfusion wurde zuerst im Schweinemodell untersucht (Boekstegers et al., 2000). Der Vorteil der selektiven druckregulierten Retroinfusion gegenüber der intramyokardia-

len Injektion ist, außer, dass keine Thorakotomie erforderlich ist, eine höhere und gleichmäßigere Genexpression (Raake et al., 2004). Dies liegt am ehesten an der längeren Kontaktzeit der applizierten Substanz mit dem Myokard und daran, dass das venöse Endothel in der Regel nicht verändert ist. Ein interessanter Punkt der einen Einfluss auf die Effektivität der retrograden Infusion über die Koronarvenen haben könnte ist konnten Kristy Red-Horse et al. zeigen (Red-Horse et al., 2010). Sie konnten nachweisen, dass venöse Zellen eine gewisse Plastizität haben, sie können sich wenn sie ins Myokard wandern entdifferenzieren und sich zu Arterien umformen. Für die therapeutische Angiogenese zeigte sich auch in klinischen Studien, dass der antegrade und der intramyokardiale Weg zu keiner klinischen Verbesserung der Patienten führt (Ylä-Herttuala und Alitalo, 2003). Bisher existieren für die retrograde Applikation von Gefäßwachstumsfaktoren nur Studien am Tiermodell. Hier zeigten sich im Schweinmodell jedoch Erfolge (Kupatt et al., 2007; Fearon et al., 2004; von Degenfeld et al., 2003; Boekstegers et al., 2000).

## 1.4 Fragestellungen

Wir gingen der Fragestellung nach, ob PDGF-B durch das Anlocken von muralen Zellen die Effektivität von VEGF-A steigern kann. Dazu haben wir einen langwirksamen adeno-assoziierten viralen Vektor mit der cDNA von VEGF-A und PDGF-B beladen und die Hypothese am Myokard von Schweinen getestet:

1. Lässt sich mit adeno-assoziierten Viren als Vektoren eine stabile Expression von PDGF-B und VEGF-A erzielen?
2. Führt die kombinierte Gabe von PDGF-B und VEGF-A zu einer besseren Gefäßversorgung des Myokards und damit zu einer besseren Funktion des Myokards als VEGF-A alleine?

# Kapitel 2

## Versuchstiere und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die Studie wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 55.2-1-54-2531-67/07). Es wurden 28 Schweine der Rasse Deutsches Landschwein von dem Lehr- und Versuchsgut der LMU in Oberschleißheim bezogen. Die Tiere wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten.

Die Tiere wurden für die gesamte Dauer des Versuchs in Gruppen bis zu drei Tieren auf 15.25 m<sup>2</sup> im Walter-Brendel-Institut in München gehalten. Am ersten Versuchstag waren die Schweine durchschnittlich 10 Wochen alt und 27 kg schwer, am Tag 28 betrug das Gewicht durchschnittlich 45 kg und am Tag 56 durchschnittlich 85 kg. Die Gruppenstruktur des Versuchs kann der Tabelle 2.1 entnommen werden.

### 2.2 Geräte und Pharmaka

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 10  $\frac{\text{mg}}{\text{kg}}$  Azaperon (Stresnil<sup>®</sup>, Janssen, Neuss), 0.02  $\frac{\text{mg}}{\text{kg}}$  Atropinsulfat (Braun, Melsungen) und 20  $\frac{\text{mg}}{\text{kg}}$  Ketamin (Hameln Pharmaceuticals, Hameln), jeweils

	Anzahl
mit rAAV.PDGF-B/VEGF-A behandelt	6
mit rAAV.VEGF-A behandelt	4
mit rAAV. Placebo behandelt	7
vorzeitig verstorben	7
Ausschluss wegen Myokardinfarkt > 8% der linksventrikulären Masse	2

**Tabelle 2.1:** Hier sieht man die Genvektoren und die entsprechende Anzahl der Tiere. Insgesamt wurden 9 Tiere von den Versuchen ausgeschlossen.

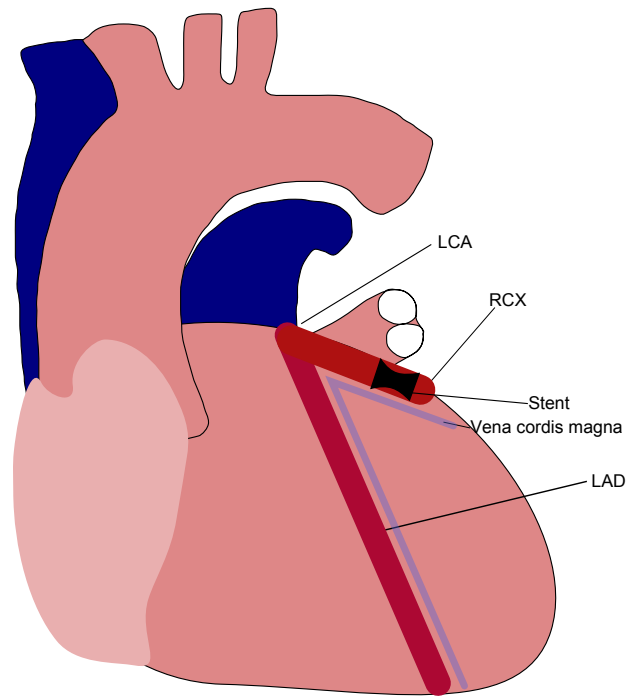
intramuskulär. Über die Ohr randvene wurde die Narkose mit 5 mg Midazolam (Ratiopharm, Ulm) und 0,05 mg Fentanyl (Janssen, Neuss) vertieft. Die Tiere wurden mit einem Laryngoskop endotracheal intubiert und in unserem Operationsaal an den Extremitäten fixiert. Unter EKG-, Aorten- und Blutsauerstoffsättigungskontrolle wurde die Narkose mit 5  $\frac{\text{ml}}{\text{h}}$  Propofol 2 % (MCT Fresenius, Bad Homburg) und Isofluran 1 % (Forene<sup>®</sup>, Abbott, Wiesbaden) fortgesetzt. Zum Volumenersatz und zur Rhythmusstabilisierung erhielten sie 0,5 l 6 % ige Hydroxyethylstärke (Braun), sowie 150 mg Amiodaron (Cordarex<sup>®</sup>, Sanofi Aventis, Frankfurt am Main) und 737,6 mg Magnesiumaspartat-hydrochlorid (Magnesiocard<sup>®</sup>, Verla-Pharm, Tutzing) gelöst in 0,5 l Natriumchlorid (Braun) intravenös. Als Zugangswege für die Herzkatheteruntersuchung wurden 9 F- und 11 F-Katheterschleusen (Cordis, Miami, USA) verwendet. Desweiteren benutzten wir einen 9 F-Judkins Rechts Führungskatheter (Cordis) einen 0,018 "/180 cm und einen 0,014 "/180 cm Führungsdraht, einen PTCA-Ballon (3 mm Durchmesser, 20 mm Länge), einen 6 F-Pigtail-Katheter (Cordis), einen 6 F-Cournard-Katheter (Cordis) sowie einen Inflator. Als Röntgenkontrastmittel wurde Iomeprol (Imeron 350<sup>®</sup>, Altana Pharm, Konstanz) benutzt. Daneben benutzen wir den temporären Herzschrittmacher Medtronic 5320 (Medtronic, Düsseldorf). Für die Druckmessung wurde ein Conductance-Katheter verwendet (Millar pressure tip catheter SPC 560, Millar Transducer Control Unit MIL-TC-510, Millar Instruments, Texas; USA). Der Reduktionsstent wurde selbst präpariert. Ein halbes Teflon Stent-Graft (Länge=13 mm) mit einer Polytetrafluorethylen-Membran (Jostent, Abbott, Wiesbaden) wurde auf eine 16 G/1,5 mm Kanüle (Becton Dickinson, Heidelberg) gefädelt. In der Mitte wurde zuerst eine Kerbe mit Hilfe



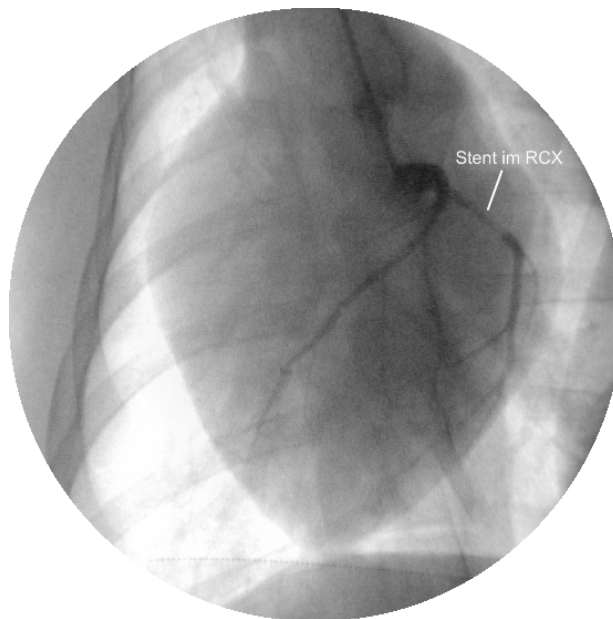
**Abbildung 2.1:** Ein Foto eines Reduktionsstents, wie er bei den Versuchen benutzt wurde. Er hat eine Länge von 13 mm und einen Durchmesser von 3 mm. Modifiziert nach (von Degenfeld et al., 2003).

eines Fadens der Größe 0 (Suprolene 91414<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt) geknotet, der Faden wurde dann entfernt. In diese Kerbe wurden erneut 5 Knoten mit einem Faden der Größe 5-0 (Prolene 8880H<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt) geknotet. Anschließend wurde der Stent auf den PTCA-Ballon mit einem Druck von 1 atm fixiert. So entstand ein Stent mit einer zentralen Durchflussöffnung von 1,77 mm<sup>2</sup>. Dies wird in den Abbildungen 2.1, 2.2 und 2.3 veranschaulicht.

Zur Antikoagulation erhielten die Tiere vor dem ersten Versuchstag zwei Tage lang je 225 mg Clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>, Sanofi, Frankfurt am Main) per os. Während der ersten Intervention erhielten sie 20000 IE Heparin (Ratiopharm) und 500 mg Acetylsalicylsäure (Aspirin i.v.<sup>®</sup>, Bayer) intravenös. Nach dem Setzen des Stents bekamen sie bis zum 10. Tag 75 mg Clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>, Sanofi) und 100 mg Acetylsalicylsäure (Aspirin<sup>®</sup>, Bayer) per os, sowie bis zum 7. Tag 3000 IE Nadroparin (Fraxiparin<sup>®</sup>, Sanofi) sub cutan. Am Tag 28 und 56, also während der zweiten und dritten Intervention erhielten sie 10000 IE Heparin (Braun) intravenös. Am Ende der ersten und zweiten Intervention bekamen die Tiere 750 mg Cefuroxim (Hikma, Klein-Winternheim) zur Infektionsprophylaxe.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der Koronargefäße. Man sieht die Lage des Reduktionssstents im proximalen Ramus Circumflexus.



**Abbildung 2.3:** Koronarangiographische Darstellung der linken Koronararterie. Die Kontrastmittelaussparung im rechten Teil des Bildes entspricht dem Reduktionsstent im Ramus Circumflexus.



## 2.3 Versuchsablauf

Tag 1	Implantation des Reduktionsstents
Tag 28	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Angiographie</li> <li>2. Druckmessung</li> <li>3. Entnahme von Serum</li> <li>4. Mikrosphären</li> <li>5. Selektive druckregulierte Retroinfusion</li> </ol>
Tag 56	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Angiographie</li> <li>2. Druckmessung</li> <li>3. Entnahme von Serum</li> <li>4. Mikrosphären</li> <li>5. Sonomikrometrie</li> <li>6. Post mortem-Angiographie</li> <li>7. Infarktfärbung</li> <li>8. Biopsien</li> </ol>

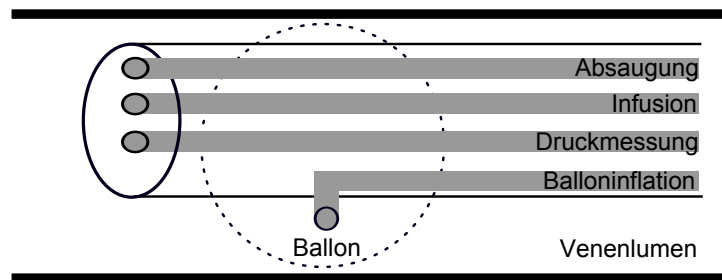
**Tabelle 2.2:** Übersicht über den Versuchsablauf an den einzelnen Versuchstagen.

Eine Übersicht des Versuchsablaufs ist in Tabelle 2.2 dargestellt. Am Tag 1 erfolgte die Induktion der myokardialen Ischämie mittels Implantation des Reduktionsstents in dem proximalen Abschnitt des Ramus circumflexus (RCX). Dazu wurde ein circa 3 cm langer Hautschnitt unter Vollnarkose oberhalb des linken Musculus sternocleidomastoideus auf halber Höhe durchgeführt, die Arteria carotis externa freipräpariert und die 9 F-Schleuse in der Arterie fixiert. Nach Sondierung der RCX mit der üblichen Herzkathetertechnik wurde der Reduktionsstent im Bereich der proximalen RCX implantiert. Die Kontrolle der Stenose erfolgte mittels Angiographie. Nach erkennbarer Stenose wurde die Schleuse entfernt und die Arteria carotis externa mit zwei Fäden (PH-Seide<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt) ligiert. Danach wurde die Wunde unter sterilen Bedingungen vernäht und das Tier unter selbstständigem Atmen wieder in den Stall gebracht. Am Tag 28 wurden eine 9 F-Schleuse in die Arteria carotis externa und zusätzlich eine 11 F-Schleuse in die Vena jugularis interna der rechten Seite gelegt. Zuerst wurde die Stenose angiographisch dargestellt. Danach wurde die globale Myokardfunktion mit Hilfe des Conductance-Katheters gemessen. Zur Messung des regionalen myokardialen Blutflusses benutzten wir die Methode der

fluoreszierenden Mikrosphären. Im Anschluss wurde unter Verwendung der selektiven druckregulierten Retroinfusion (SSR) entweder bei den Kontrollen Tyrode Puffer oder bei den zu behandelnden Tieren in Phosphat-gepufferte Salzlösung suspendierte Adeno-assoziierte Viren (AAV) appliziert. Der Wundverschluss und die Ausleitung erfolgten analog zum Tag 1. Für den letzten Versuchstag, den Tag 56, wurden die arteriellen und venösen Gefäßzugänge in die Arteria carotis interna beziehungsweise in die Vena jugularis externa gelegt. Die Angiographie, die Druckmessung und die Messung mit den Mikrosphären erfolgten in gleicher Weise wie am Tag 28. Es wurden lediglich zwei andere Spektralbereiche der Mikrosphärensuspensionen gewählt. Die regionale Myokardfunktion wurde mit der Ultraschalllaufzeitmethode bewertet. Dazu mussten Sonomikrometrie-Kristallpaare in das schlagende Herz implantiert werden. Unter Analgesie und Muskelrelaxation wurde das Sternum mittels Schere und Sternum-Sperrer eröffnet. Die Kristalle wurden dann in das ischämische RCX-Areal und in das nichtischämische LAD-Areal implantiert. Die Funktionsmessung erfolgte sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter „atrialem pacing“. Im Anschluss erfolgte die Tötung durch Entnahme des durch kardioplege 40 mval Kaliumchloridlösung gelähmten Herzens. Zur Analyse der Kollateralen wurde eine post mortem Koronarangiographie erstellt. Dafür wurde über ein Insert einer 7 F Schleuse das Kontrastmittel in den linken Koronarhauptstamm injiziert. Die spätere Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige und verblindete Untersucher. Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen sowie für die Messungen des regionalen myokardialen Blutfluss entnahmen wir 9 Proben aus dem RCX-Gebiet und 2-3 Proben aus dem LAD-Gebiet sowie Organproben.

## 2.4 Hard- und Software

Zur Messung des Linksventrikulären Drucks benutzen wir einen Personal Computer (Pentium4, 3 GHz, 248 MB RAM) mit MS-DOS 6.22 (Microsoft, Redmond, USA) und dem Programm Conduct 2000 V.0150.9 (Cardiodynamics, San Diego, USA). Diesem wurde ein Sigma 5 DF<sup>®</sup>,CD



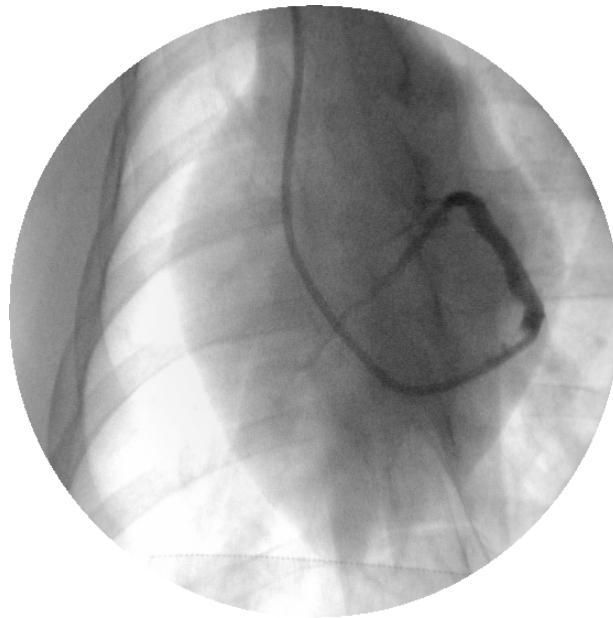
**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung des SSR-Katheters. Die grauen Streifen entsprechen den Lumina innerhalb des Katheters. Der gestrichelte Kreis stellt den aufblasbaren Ballon dar mit dem das Venenlumen verschlossen werden kann.

Leycom, Zoetermeer, Niederlande) vorgeschaltet. Zur Speicherung und Auswertung des Linksventrikulären Drucks, des Aortendrucks, des Elektrokardiogramms und des Signals der Sonomikrometrie benutzten wir einen PC (Pentium3, 733 MHz, 128 MB RAM) mit Windows 98SE (Microsoft, Redmond, USA) und dem Programm Sonosoft Version 3.4.26 RC3 (Cardiosoft, Houston, USA).

## 2.5 Methoden

### 2.5.1 Die selektive druckregulierte Retroinfusion

Zur Applikation der Viren verwendeten wir das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion in die Koronarvenen (SSR). Die SSR wurde 1990 von Boekstegers et al. entwickelt und steht seit 1997 in der heutigen Form zur Verfügung (PTC Myoprotect SSR, Pro-Med, Mödling, Österreich). Mit dieser Methode ist es möglich, ischämisches Myokard retrograd über die Herzvene mit arteriellem Blut zu perfundieren oder aber auch Substanzen zu infundieren. Hierfür wurde ein vierlumiger abgewandelter Swan-Ganz-Katheter in die Vena Interventricularis Anterior platziert. Der Aufbau des Katheters kann der Abbildung 2.4 entnommen werden. Die Retroinfusion erfolgte druckgesteuert und pulsatil während der Diastole. Dafür wurde in die Vena cordis magna mit einem Druck, der 20 mmHg über dem Venenverschlussdruck lag, retroinfundiert. Der



**Abbildung 2.5:** Koronarangiographische Darstellung der Koronarvenen. Im rechten Bildteil ist die Blockierung der distalen Vena Interventricularis Anterior zu erkennen.

Venenverschlussdruck wurde zuvor bei geblocktem Ballon in der Systole bestimmt.

Das Legen des Katheters erfolgte über die venöse Schleuse, wobei der Sinus Coronarius mit einem 7F-Cournard-Katheter unter Röntgenkontrolle aufgesucht wurde und ein 0,18'' Führungsdraht in die Vena coronaria sinistra, respektive die Vena interventricularis sinistra vorgeschoben wurde. Über diesen Draht ließ sich dann der SSR-Katheter im ischämischen Gebiet positionieren. In Abbildung 2.5 sieht man eine angiographische Darstellung. Nach Blocken des Ballons im distalen Teil der Vena interventricularis sinistra ließ sich mit dieser Technik eine Verweildauer des Infusats von  $9,5 \pm 2,5$  s erzielen (Boekstegers et al., 2000).

Die Viren wurden in einer 50 ml Spritze mit 15 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung aufgezogen und in einen Perfusor eingespannt. Dieser führte sie, geschützt durch ein Rückschlagventil, dem Infusionsstrom zu, wobei wir als Infusion 0,9 prozentiger Kochsalzlösung benutzten. Die Gesamtdauer der Applikation betrug 10 Minuten.

Nach Beenden der Applikation wurde der SSR-Katheter entblockt und unter Röntgenkontrolle entfernt.

### 2.5.2 Die regionale myokardiale Perfusion

Zur Bestimmung der regionalen myokardialen Perfusion benutzten wir fluoreszierende Polystyren Mikrosphären (Fluospheres<sup>®</sup>, Invitrogen, Paisley, UK). Diese haben einen Durchmesser von 15  $\mu\text{m}$  und bleiben dadurch in den Kapillaren hängen, denn diese haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 4-15  $\mu\text{m}$ . Dadurch lässt sich nach Messung der Fluoreszenzaktivität einer Gewebeprobe und einer Referenzprobe bei bekanntem Abzugsfluss die regionale myokardiale Perfusion nach der folgenden Formel berechnen.

$$rmp(ml * g/min) = \frac{fluss * igp}{irp * m} \quad (2.1)$$

rmp = Regionale myokardiale Perfusion

fluss = Fluss der Referenzprobe

igp = Fluoreszenzaktivität der Gewebeprobe

irp = Fluoreszenzaktivität der Referenzprobe

m = Gewicht der Gewebeprobe

Die Mikrosphären sind in unterschiedlichen Spektralbereichen verfügbar, wobei wir für jede Messung einen anderen Spektralbereich benutzten. Wir verwendeten pro Spektralbereich 5 ml Mikrosphärenlösung, die circa  $5 \cdot 10^6$  Mikrosphären entsprechen. Die Mikrosphären wurden mittels Vortexer (Vortex Genie 2, Bender und Hobein, Zürich, Schweiz) und Ultraschallbad (Sonorex TK52H, Bandelin, Berlin) durchmischt und dann in 10 ml 10 prozentigem Dextran suspendiert. Die Suspension wurde mit einem 6 F-Pigtail-Katheter in den linken Ventrikel über 1 Minute infundiert. Gleichzeitig wurde über die arterielle Schleuse mittels einer Rückzugspumpe (Harvard Apparatus Withdrawal Pump, Holliston, USA) in mit Citrat gefüllte Spritzen die Referenzprobe gewonnen. Der Abzugsfluss betrug 4,1 ml/min und die Abzugsdauer 3 Minuten, also zwei Minuten länger als die Infusion. Danach wurden die Mikrosphären aus den Referenzproben durch

jeweils einen Filter abgefangen. Wir führten am Tag 28 und am Tag 56 jeweils eine Messung unter der Ruhefrequenz und eine unter Schrittmachererregung durch (HF:130/min). Nach Entnahme des Herzens wurden Proben aus dem gesamten linken Ventrikel gewonnen und nach epi- und endokardialen Ursprung geteilt. Die Proben wurden in einem Fluoreszenzreader verdaut und die Fluoreszenzaktivität gemessen.

### 2.5.3 Die globale Myokardfunktion

Zur Beurteilung der globalen Myokardfunktion maßen wir den endsystolischen linksventrikulären Druck (LVP), den enddiastolischen linksventrikulären Druck (LVEDP), die Anstiegs geschwindigkeit des LVP ( $\Delta\text{LVP}/\Delta t$ ) und die Ejektionsfraktion (EF).

#### Messung des Aortendrucks

Die Messung des Aortendrucks (AP) diente der Überwachung des Tieres während der Operation und erfolgte über eine in der Arteria carotis communis liegende 9 F-Schleuse. Diese war mit einem Druckabnehmer (Stetham Transducer, Hellige-Monitor, Freiburg) verbunden und wurde durch das Computerprogramm Sonosoft aufgezeichnet. Vor der Messung des AP wurde der Druck = 0 mmHg mit dem aktuellen Luftdruck gleichgesetzt.

#### Linksventrikuläre Druckmessung

Die linksventrikulären Drücke wurden mit einem Conductance-Katheter gemessen. Dieser wurde unter Röntgenkontrolle in den linken Ventrikel platziert und auf die Werte 0 und 100 mmHg kalibriert. Die Aufzeichnung erfolgte EKG-synchronisiert mit Sonosoft. Es wurde sowohl der endsystolische linksventrikuläre Druck (LVP), als auch der enddiastolischen linksventrikulären Druck (LVEDP) gemessen. Der LVEDP dient zur Beurteilung einer Herzinsuffizienz. Dabei steigt dieser bei reduzierter Auswurfsleistung an. Aus der Veränderung des LVP über die Zeit ließ sich

$(\Delta LVP/\Delta t)$  berechnen (Sonosoft). Dieser Wert gibt die Geschwindigkeit der Druckänderung an und gibt Auskunft über die Kontraktilität des Myokards.

### Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF)

Die EF wurde planimetrisch bestimmt (ImageJ, NIH, Bethesda, USA). Dazu wurden Ventrikulographiebilder aus der Endsystole mit Bildern aus der Enddiastole verglichen.

#### 2.5.4 Die regionale myokardiale Funktion

Für die Bestimmung der regionalen myokardialen Funktion verwendeten wir die Methode der Sonomikrometrie. Dieses Verfahren beruht auf der Messung von Ultraschalllaufzeiten. Dafür implantierten wir am Tag 56 am sternotomierten Tier jeweils zwei piezoelektrische Kristalle (2 mm Durchmesser, Sonometrics, London, Canada) in das ischämische (RCX) und das Kontrollmyokard (LAD). Die Implantation erfolgte nach Inzession des Myokards an je zwei Stellen parallel zur Faserrichtung. Danach wurden die Kristalle bis kurz vor das Endokard vorgeschoben. Der eine Kristall sendet ein Ultraschallsignal mit 5 Megahertz aus, der andere empfängt es und gibt es an das Messgerät (Sonometrics TRX Series 6) mit angeschlossenem PC weiter (siehe Abbildung 2.6). Diese berechnen, bei bekannter Ausbreitungsgeschwindigkeit und gemessener Ausbreitungszeit, den absoluten Abstand der Kristalle zueinander nach folgender Formel.

$$Abstand = Geschwindigkeit * Zeit \quad (2.2)$$

Da wir gleichzeitig auch ein Elektrokardiogramm (EKG) ableiteten, konnten wir die Kristallabstände zu den endsystolischen (ESL) und den enddiastolischen Zeitpunkten (EDL) zuordnen. Nach Formel 2.3 lässt sich die relative Segmentverkürzung (SES) berechnen. Wir benutzen für



**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung der Sonomikrometrikristalle im Myokard. Links wird die Situation während der Diastole dargestellt, rechts die Situation während der Systole. Es kommt zu einer deutlichen Änderung des Abstands der Mikrokristalle zueinander.

die Segmentverkürzung den Mittelwert aus fünf Einzelberechnungen.

$$SES = \frac{EDL - ESL}{EDL} * 100 \quad (2.3)$$

### 2.5.5 Die Färbung des ischämischen Gewebes

Die Färbung des ischämischen Gebiets wurde sofort nach der Entnahme des Herzens durchgeführt. Dazu wurde der linke Koronarhauptstamm (LCA) mit einer Katheterschleuse kanüliert und 15 ml Tetrazoliumrot (10%) injiziert. Dadurch wurde das vitale Gewebe rot angefärbt und ließ sich vom avitalen, fibrosierten Infarktgebiet abgrenzen. Das Herz wurde senkrecht zur langen Achse in Scheiben geschnitten und digital fotografiert (MVC-FD81, Sony, Berlin). Anschließend wurden die Fotos computergestützt vermessen (ImageJ) und Infarktgröße/Größe des linken Ventrikel berechnet. Wenn der Infarkt über 8% der linksventrikulären Masse betrug wurde das Tier vom Experiment ausgeschlossen.

### 2.5.6 Virusproduktion

Als Vektoren benutzten wir 2/9-pseudotypisierte Adeno-Assoziierte Viren. Die viralen Vektoren wurden mit drei Plasmiden hergestellt. Das erste Plasmid kodierte die Transgene (VEGF-A, PDGF-B oder LacZ) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, der an die „cis AAV 2 internal



terminal repeats“ (ITR) grenzte. Das zweite Plasmid kodierte AAV 2 rep und „AAV 9 cap in trans“. Das dritte Plasmid fügte schließlich adenovirale Hilfsfunktionen hinzu. Die Transfektion wurde an U293-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zuerst gesplittet, so dass am nächsten Tag eine 70-80 prozentige Konfluenz entstand. Dann wurden die Zellen für 2 Stunden in serumfreies „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM) gegeben. Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die Plasmide mit Polyethyleimin (PEI) und DMEM gelöst und auf die Zellen appliziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium zu DMEM/10% FBS/1% P/S gewechselt. 48 Stunden später wurde das Medium abgesaugt und die Zellsuspension für 15 min bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet freigesaugt, in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst und erneut zentrifugiert. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen auf -80°C gefroren und anschließend mittels Caesiumchlorid-Gradienten gereinigt. Der Virustiter wurde mittels RealTime-PCR gegen den polyA Schwanz des Vektors bGH bestimmt. Die Forward Primer Sequenz war 5'-tctagtgccagccatctgtgt-3', die Reverse Primer Sequenz war 5'-tgggagtggcaccttcca-3'. Als Placebovektor wurde das AAV ohne codierende Sequenz beladen (rAAV.Placebo).

### 2.5.7 Nachweis des Gentransfers

Zum Nachweis der Expression von VEGF und PDGF benutzten wir die Methode des Western-Blots. Um die Proteine aus den Myokardproben zu isolieren wurden die auf -80°C gefrorenen Gewebe in einen Präparationspuffer gegeben und gemörsert. Anschließend wurden die Proben zuerst auf Trockeneis gelagert und dann bei 37°C schockgetaut. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 14000 U/min, danach wurde der Überstand abgetrennt. Die SDS-PAGE-Elektrophorese und das Western Blotting erfolgten nach Standardprotokoll. Bei der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE benutzten wir ein 15%iges Acrylamidgel mit folgender Zusammensetzung für 100ml: 66,63 ml 30% Acrylamid, 16,6 ml 2 M Tris pH 8,9, 0,663 ml 0,5 M EDTA, 16,11 ml Aqua dest. Die Proben wurden anschließend in einem Tank auf eine PVDF-Membran

(Immobilon-P, Millipore, Schwalbach) geblottet. Die benutzten Antikörper können der Tabelle 2.3 entnommen werden. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mit dem Amersham ECL

	Name	Konzentration
primärer AK VEGF	rabbit polyclonal IgG to VEGF 147 (sc-507, Santa Cruz, Heidelberg)	1:1000
sekundärer AK VEGF	goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa Cruz)	1:3000
primärer AK PDGF	Rabbit polyclonal to PDGF BB (ab23914 Abcam, Cambridge UK)	1:1000
sekundärer AK PDGF	goat anti rabbit IgG-HRP (Zymed)	1:3000
primärer AK Actin	goat polyclonal IgG to Actin (I-19) (sc-1616, Santa Cruz)	1:1000
sekundärer AK Actin	donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2033, Santa Cruz)	1:3000

**Tabelle 2.3:** Übersicht über die für das Western Blotting verwendeten Antikörper.

Western Blotting System (GE Healthcare, München) und einem Röntgenradiographen.

### 2.5.8 Kapillardichte

#### Immunhistochemie

Wir untersuchten Gewebeproben aus den Bereichen des RCX und des LAD. Zuerst wurden 5  $\mu\text{m}$  dünne Gefrierschnitte angefertigt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden die Schnitte fünf Minuten lang mit Azeton fixiert und 10 Minuten getrocknet. Nachdem die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger mit einem Papstift umfahren wurden, wurden sie für fünf Minuten mit PBS benetzt. Danach wurde für 30 Minuten Blockinglösung aufgetragen (Antibody Diluent, Background Reducing, Dako, Hamburg). Die Kapillaren wurden mit primären Antikörpern gegen PECAM-1 (SC1506 goat polyclonal, Santa Cruz) gefärbt. Diese wurden in einer Verdünnung von 1:20 und einer Menge von 100  $\mu\text{l}$  pro Schnitt aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Perizyten wurden analog dazu mit Antikörpern gegen NG-2 (AB5320, rabbit polyclonal, Millipore, Schwalbach) gefärbt, allerdings in einer Verdünnung von 1:200. Als sekundäre Antikörper kamen für das PECAM-1 Rhodamin-konjugierte Donkey-anti-Goat-IgG

(SC2094, Santa Cruz) und für das NG-2 FITC-konjugierte Bovine-anti-rabbit-IgG zum Einsatz. Beide wurden in einer Verdünnung von 1:50 in einer Menge von 100  $\mu$ l aufgetragen und bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Kapillaren und die NG-2 positiven Zellen in jeweils fünf Sichtfeldern durch einen verblindeten Untersucher ausgezählt.

### **Färbung mit alkalischer Phosphatase**

Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll von Ziada et al. (Ziada et al., 1984). Die aufgetauten und getrockneten Gefrierschnitte wurden über eine Stunde bei 37°C in der Färbelösung inkubiert. Diese enthielt 30 mg nitroblue-tetrazolium (Sigma) und 6 mg 5-bromo-4-chloro-indolylphosphat p-toluidin Salz (Sigma). Dies wurde in 30 ml Puffer (pH 9,2-9,4) mit folgender Zusammensetzung gelöst: 6,9 mmol/l MgSO<sub>4</sub> (Merck), 27,5 mmol/l B<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub> und Aqua Dest. Anschließend wurden die Schnitte dreimal kurz in PBS getaucht, in 4 przentigem Formaldehyd (pH 7,3) über 5 Minuten fixiert und für eine Minute in Aqua Dest gewaschen. Zum Schluss wurde noch mit Kernechtrot für eine Minute gegengefärbt und mit PBS gewaschen.

## **2.6 Statistik**

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standard Error Of The Mean (SEM) angegeben. Zunächst wurden die Ergebnisse im einseitigen ANOVA-Test geprüft. Bei einem signifikanten Unterschied wurden die Gruppen mit „Multiple Comparison Tests“ nach Bonferroni analysiert. Zwei Gruppen wurden mit dem Student's T-Test verglichen. Als Statistiksoftware wurde SPSS (Version 17.0.2) verwendet. Als Signifikanzgrenze wurde  $p < 0,05$  gewählt.

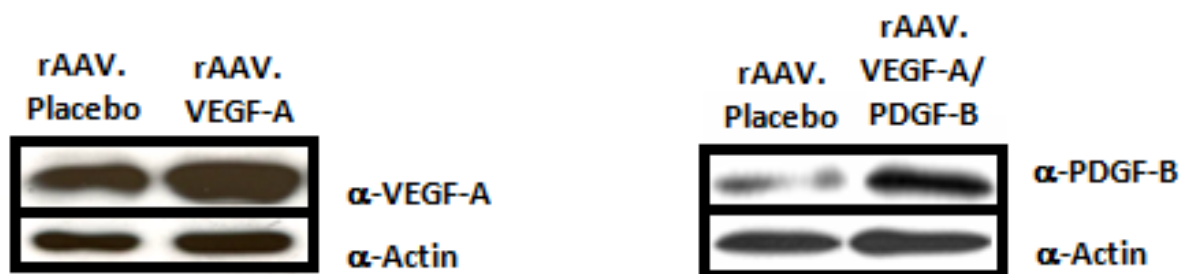


# Kapitel 3

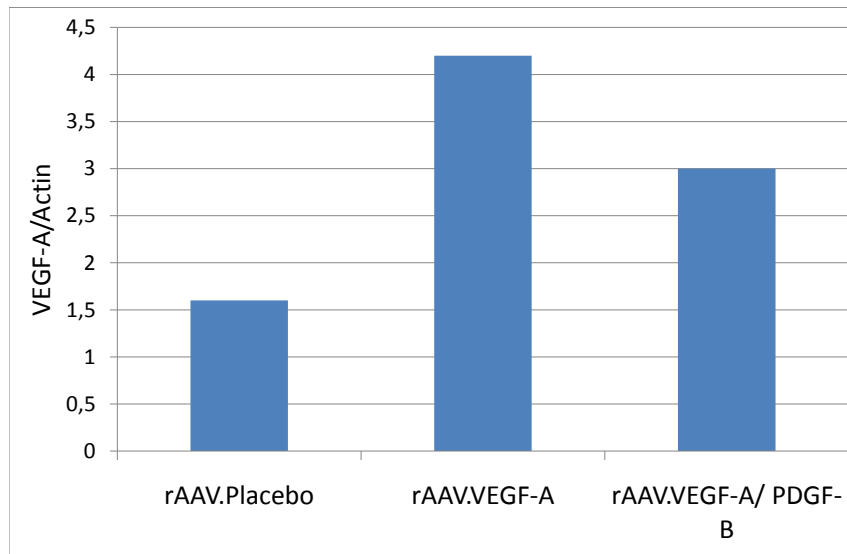
## Ergebnisse

### 3.1 Nachweis des Gentransfers

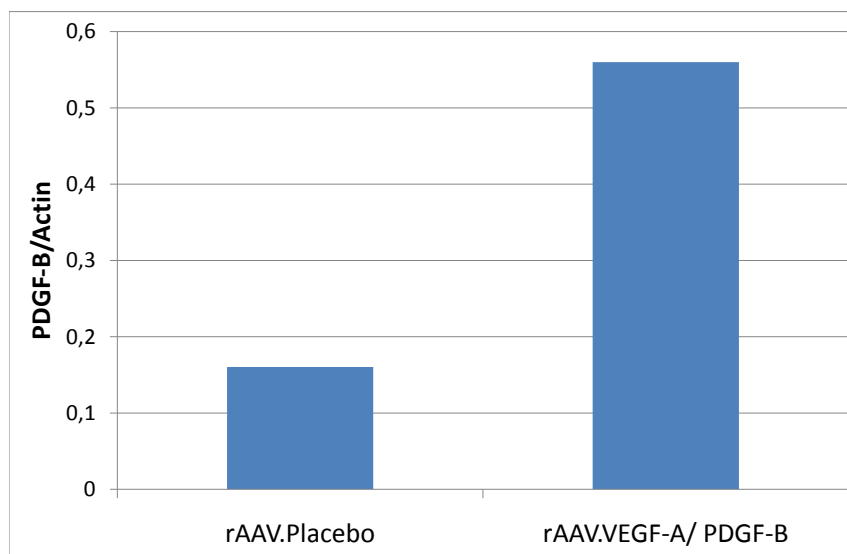
Wir untersuchten die Genexpression in den Proben aus dem RCX- und dem LAD-Gebiet mittels Westernblot. Hierbei konnte vier Wochen nach der Behandlung in beiden Gebieten eine erhöhte Expression sowohl von VEGF-A als auch von PDGF-B nachgewiesen werden (Abbildung 3.1, 3.2 und 3.3).



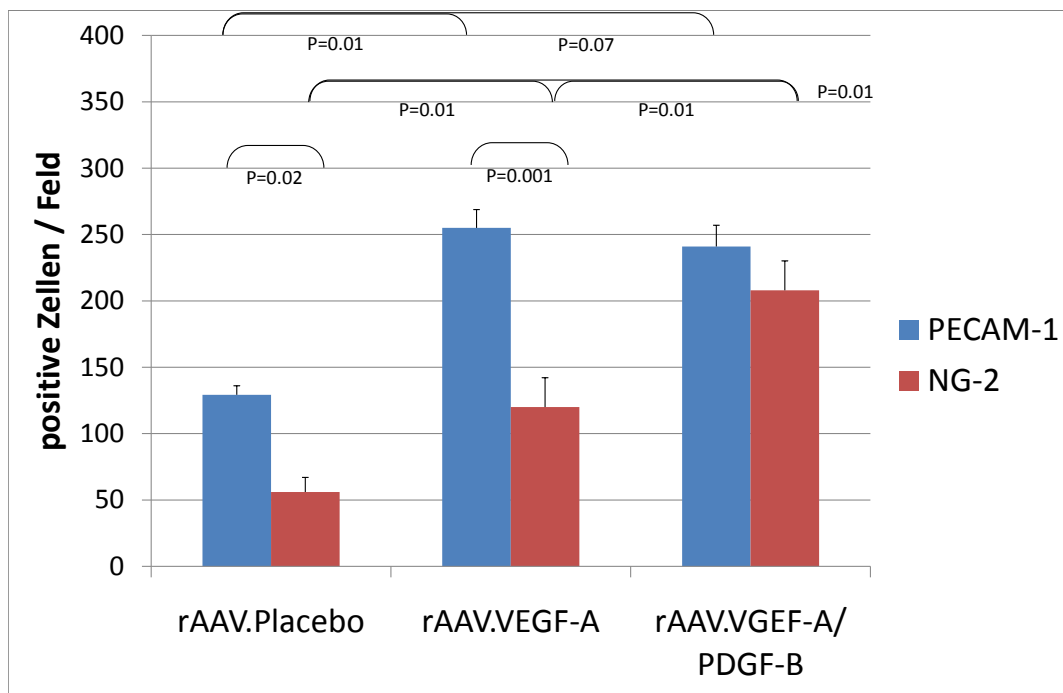
**Abbildung 3.1:** Westernblot aus den untersuchten Myokardgebieten. Es zeigen sich erhöhte Expressionen von VEGF-A und PDGF-B.



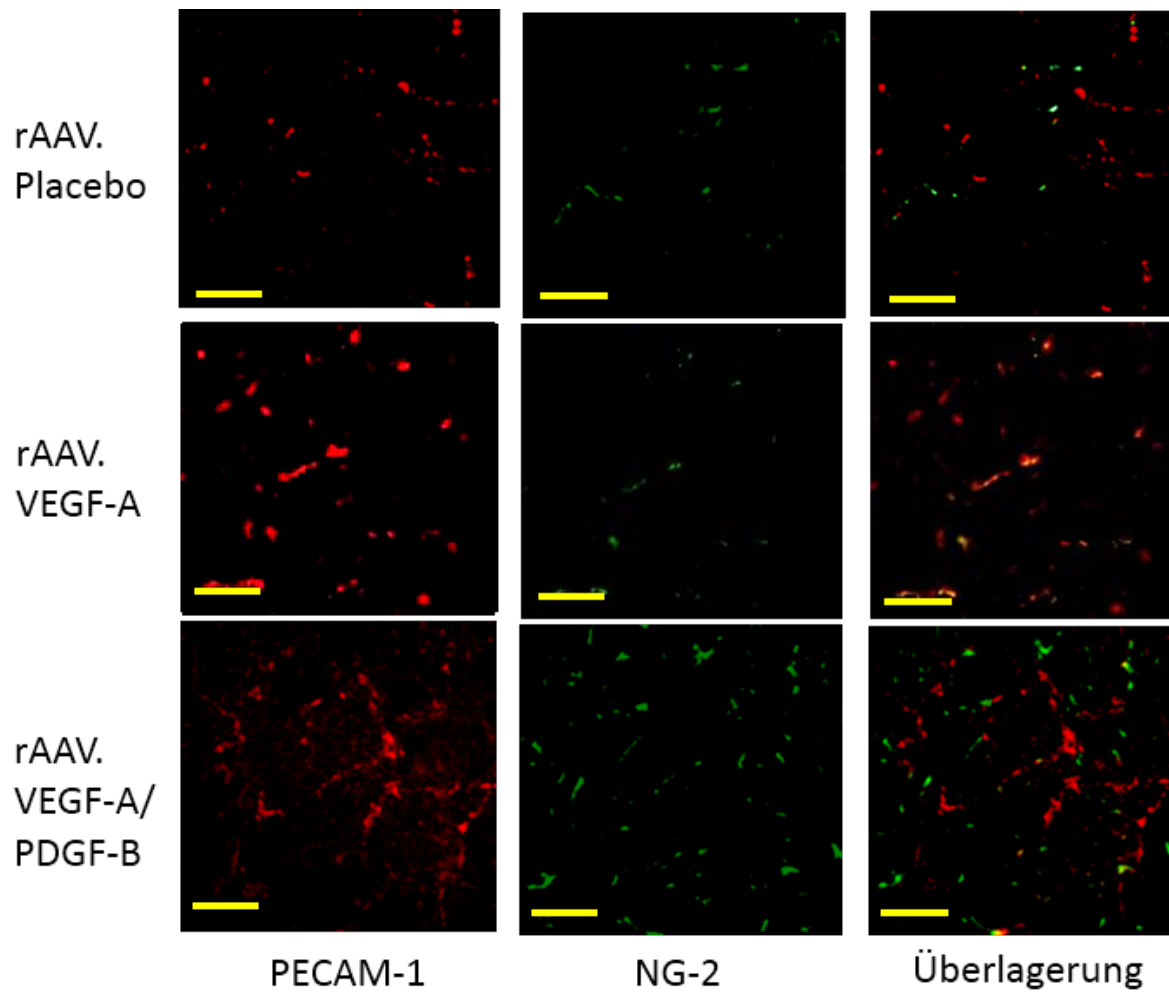
**Abbildung 3.2:** Die Abbildung 3.2 zeigt die Quantifizierung der VEGF Expression mittels Densitometrie.



**Abbildung 3.3:** Die Abbildung 3.3 zeigt die Quantifizierung der PDGF Expression mittels Densitometrie.



**Abbildung 3.4:** Quantifizierung der PECAM-1 und NG-2 positiven Zellen im ischämischen Gebiet, vergleichen Sie auch 3.5.



**Abbildung 3.5:** Das ist ein Beispiel für eine immunhistochemische Färbung der PECAM-1 und NG-2 positiven Zellen im ischämischen Gebiet.



## 3.2 Kapillardichte

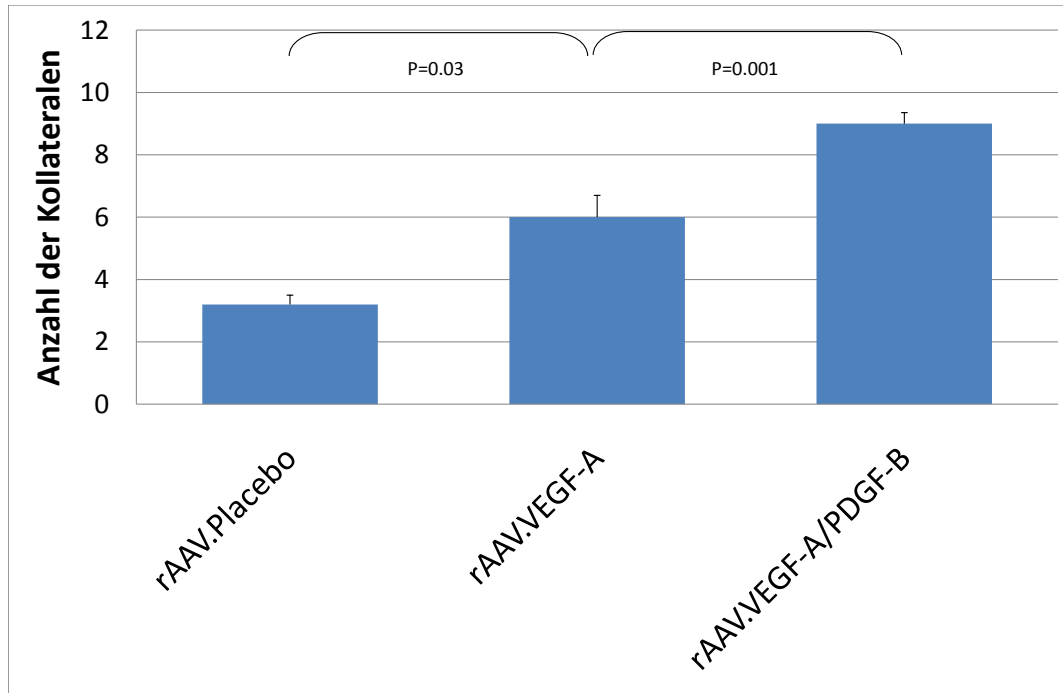
Wir führten immunhistologische Färbungen zum Nachweis von PECAM-1 positiven Zellen, die mit der Kapillardichte korrelieren, und von NG-2 positiven Zellen, die den Perizyten entsprechen, durch. Hierbei zeigte sich im ischämischen Gebiet bei beiden Zelltypen eine Zunahme der Zellzahl am Tag 56. Obwohl die alleinige VEGF-A-Gabe die Kapillardichte um das 2,1-fache erhöhte, konnte es den Perizytenbesatz nicht steigern. (Abbildung 3.4 und 3.5). Dies zeigt, dass nur die kombinierte Gabe von rAAV.VEGF-A und rAAV.PDGF-B zu einer Bildung von stabilen Kapillaren beziehungsweise mit Perizyten besetzten Kapillaren führte.

## 3.3 Kollateralgefäße

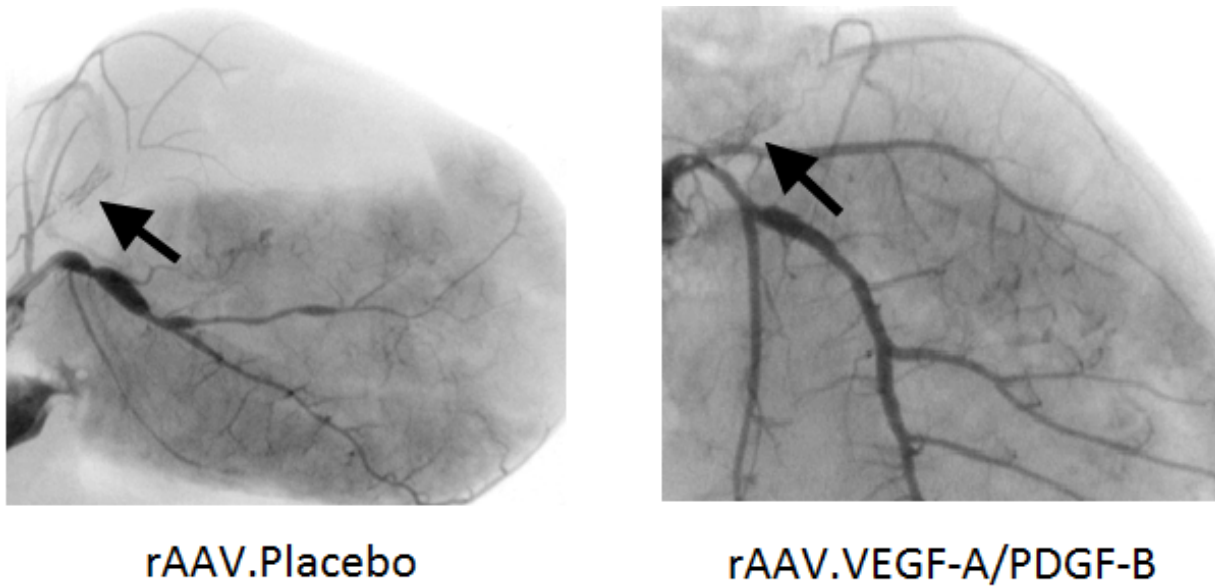
Die Anzahl der Kollateralgefäße stieg von  $2,7 \pm 0,5$  in der Placebogruppe auf  $9,0 \pm 0,4$  in der rAAV.VEGF-A/PDGF-B Gruppe (Abbildung 3.6). Abbildung 3.7 zeigt eine Darstellung der Koronargefäße nach der Injektion von Kontrastmittel in die linke Koronararterie. Hierbei ist die Kollateralisierung in dem stenosierten RCX-Areal gut zu sehen. Zur qualitativen Bewertung der Kollateralen benutzten wir den Rentrop Score (Cohen und Rentrop, 1986). Hierbei entsprechen null Punkte einem nicht gefülltem Gefäß, ein Punkt der Füllung eines Nebenastes, zwei Punkte der teilweisen Füllung eines Hauptgefäßes und drei Punkte der vollständigen Füllung eines Hauptgefäßes. Ein Effekt zeigte sich nur in der rAAV.VEGF-A/PDGF-B Gruppe ( $2,4 \pm 0,2$  vs.  $1,1 \pm 0,2$ ,  $p=0,02$ ) (Abbildung 3.8).

## 3.4 Die regionale myokardiale Perfusion

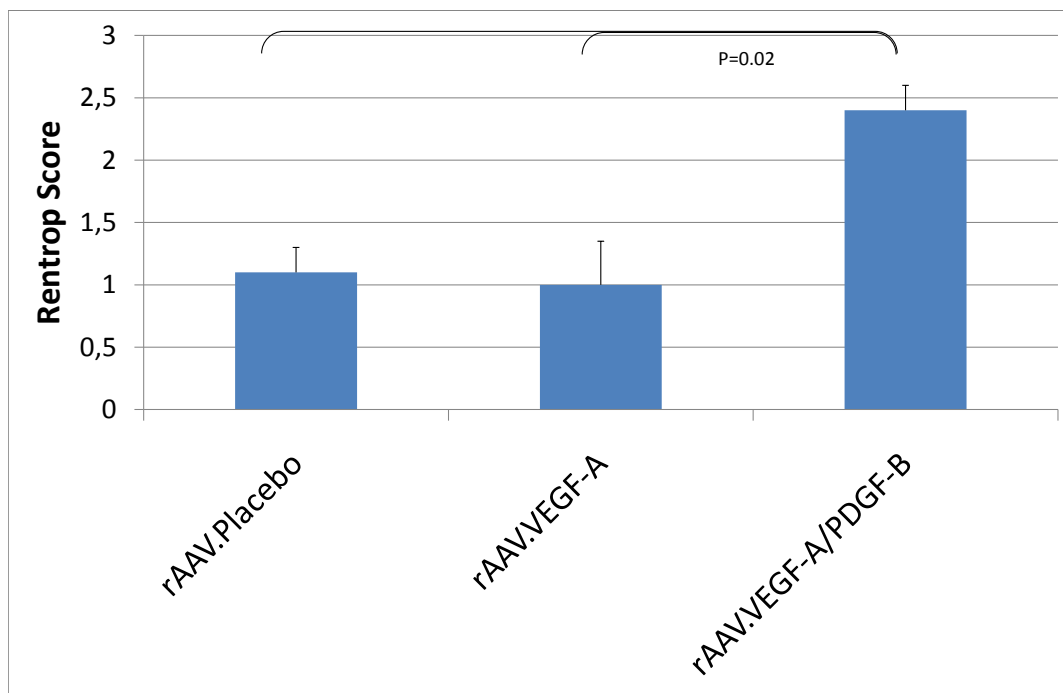
Die Messung der regionalen Durchblutung mittels Mikrosphären zeigte sowohl bei den Kontrollen als auch bei der AAV.VEGF-A Gruppe eine verminderte Perfusion im RCX-Gebiet ( $77 \pm 2\%$  und  $85 \pm 2\%$  des nicht ischämischen Gebiets) (Abbildung 3.9). Bei der rAAV.VEGF-A/PDGF-



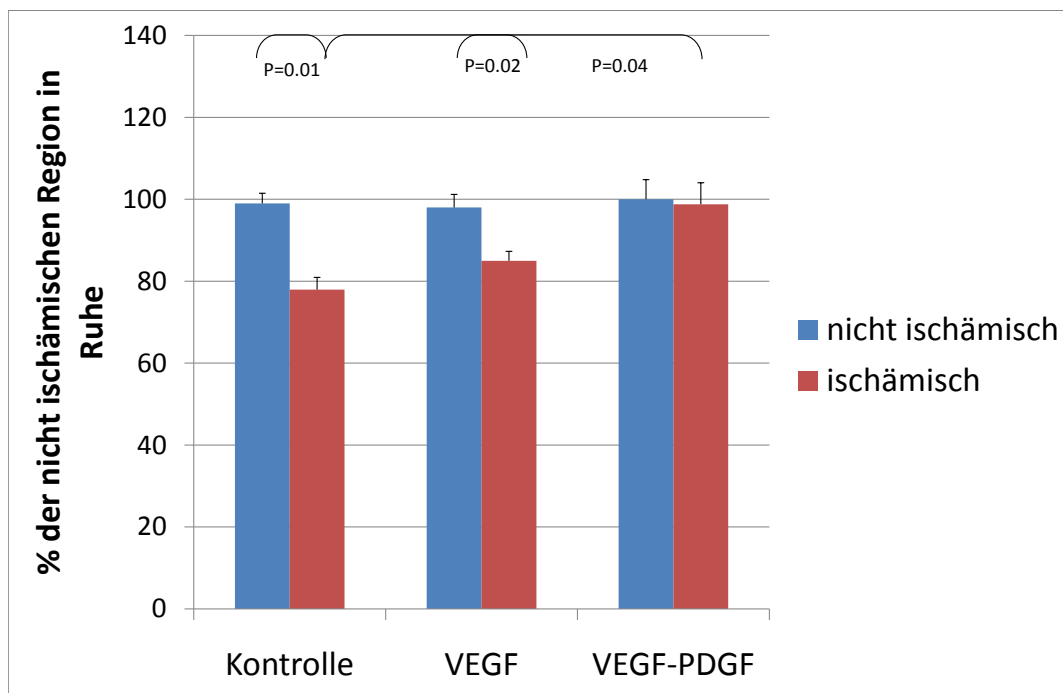
**Abbildung 3.6:** Quantifizierung der Kollateralgefäße nach Auszählen von Angiographiebildern.



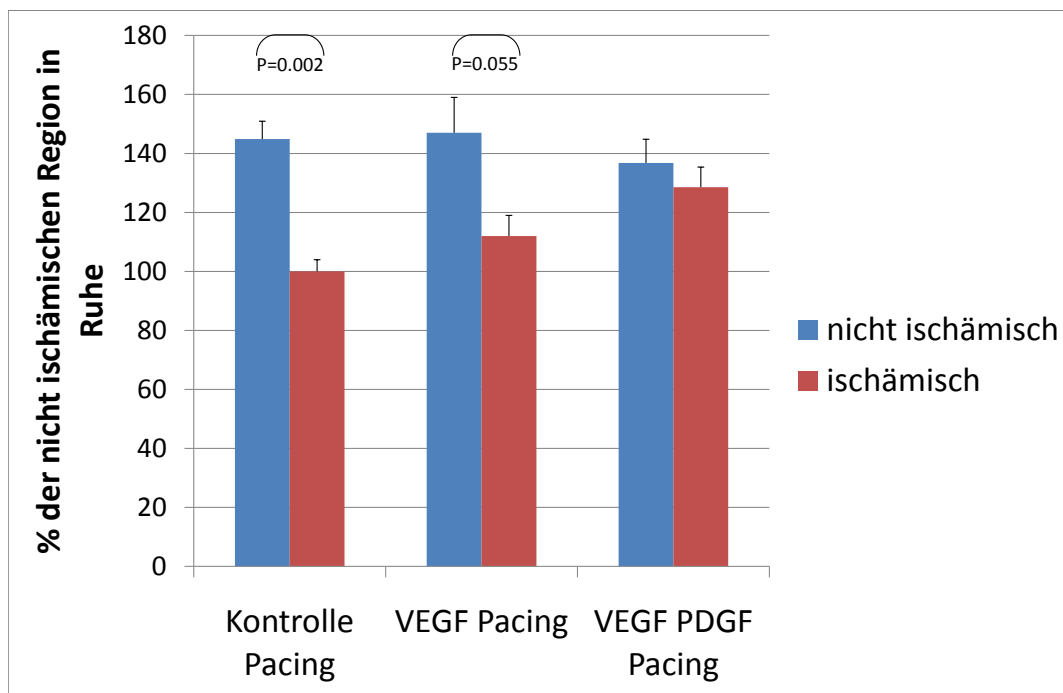
**Abbildung 3.7:** Angiographische Darstellung der linken Koronararterie. Der Pfeil zeigt auf den Reduktionsstent im Ramus Circumflexus.



**Abbildung 3.8:** Der Rentrop Score dient der Beurteilung der Qualität der Kollateralen. Je höher der Wert, desto besser sind die Gefäße gefüllt.



**Abbildung 3.9:** Darstellung der regionalen Perfusion unter Ruhebedingungen mit einer Herzfrequenz von 60/min.



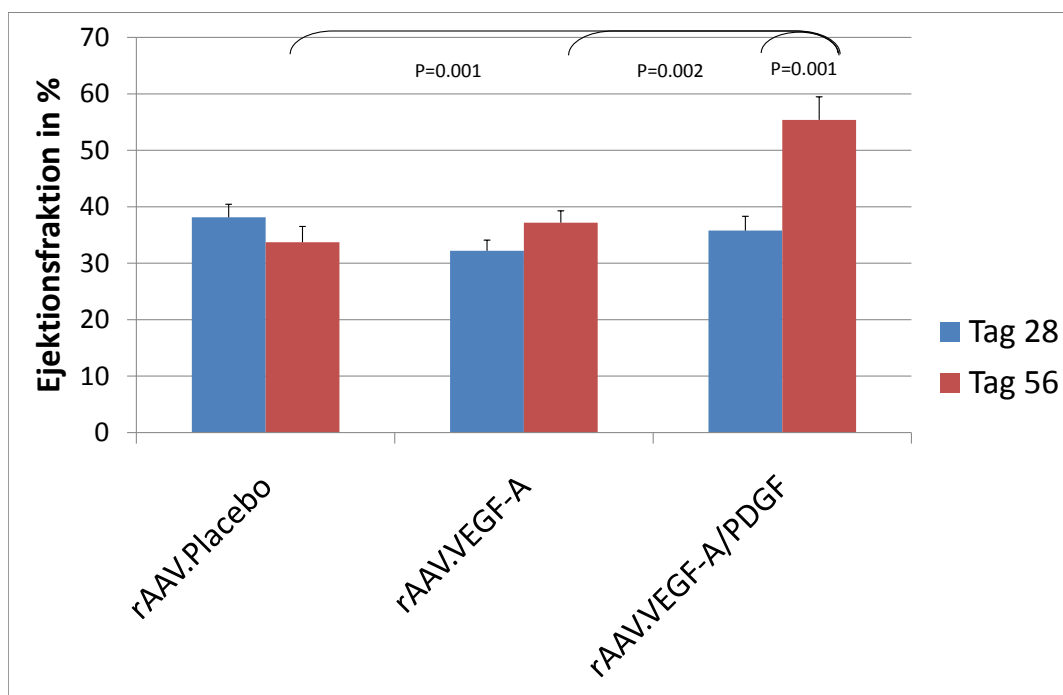
**Abbildung 3.10:** Darstellung der regionalen Perfusion unter Schrittmacherstimulierung mit einer Herzfrequenz von 150/min.

B Gruppe lag diese bei  $97 \pm 5\%$ . Um die Flussreserve zu beurteilen, haben wir die Messung unter Schrittmacherstimulation (HF:150/min) wiederholt (Abbildung 3.10). Bei den Kontrollen zeigte sich im nicht ischämischen Areal eine Zunahme der Perfusion auf  $144 \pm 6\%$  ( $p = 0,002$ ) im Vergleich zur Ruhe, im ischämischen Areal blieb sie unverändert. Dies deutet hier auf eine stark eingeschränkte koronare Flussreserve hin. In der rAAV.VEGF-A Gruppe stieg die Durchblutung auf  $112 \pm 7\%$  im ischämischen Gebiet und  $147 \pm 12\%$  im nicht ischämischen Gebiet ( $p = 0,055$ ). In der Gruppe mit rAAV.VEGF-A/PDGF-B war die koronare Flussreserve im ischämischen Gebiet noch ausgeprägter. Hier ließ sich die Durchblutung auf  $128 \pm 12\%$  steigern, im nicht ischämischen Gebiet auf  $137 \pm 10\%$  ( $p =$  nicht angegeben vs. nicht ischämischen Gebiet,  $p < 0,05$  vs. Placebo).

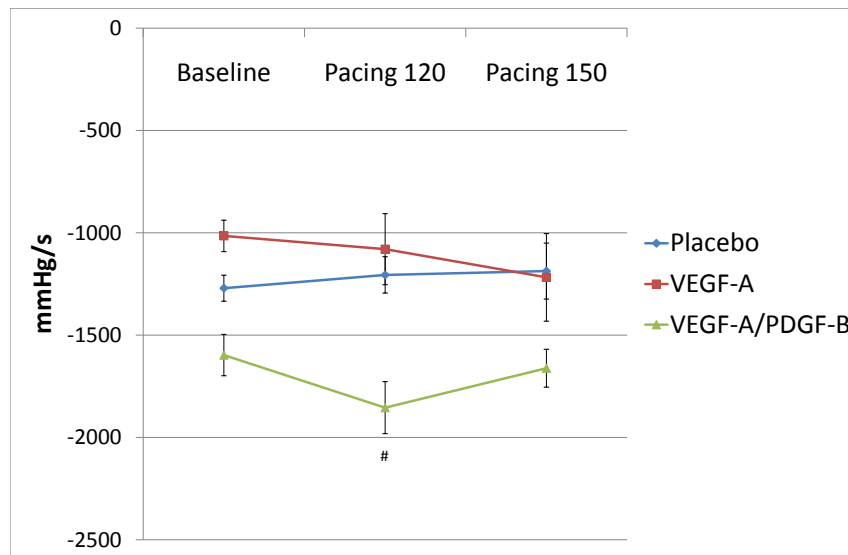
### 3.5 Die globale myokardiale Funktion

Die Ejektionsfraktion (EF) war am Tag 28 bei allen Tieren mittelgradig vermindert (Abbildung 3.11). Am Tag 56 hatte sich diese weder in der Placebogruppe (von  $38,1 \pm 2,3\%$  auf  $33,7 \pm 2,8\%$ ) noch in der VEGF-Gruppe (von  $32,2 \pm 1,9\%$  auf  $37,2 \pm 2,1\%$ ) signifikant verändert. In der VEGF-PDGF Gruppe hingegen stieg die Ejektionsfraktion von  $35,8 \pm 2,6\%$  auf  $55,4 \pm 4,1\%$  ( $p < 0,05$ ) und war damit nur noch leichtgradig eingeschränkt.

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) stieg vom Tag 28 zum Tag 56 bei den Kontroll- und bei den VEGF-Tieren nicht signifikant von  $17,1 \pm 1,2$  auf  $19,4 \pm 1$  mmHg bzw. von  $15,5 \pm 0,6$  auf  $15,8 \pm 0,8$  mmHg. Bei den Tieren, die mit rAAV.VEGF-A/PDGF-B behandelt wurden, sank der LVEDP von  $16,8 \pm 0,9$  auf  $12,9 \pm 0,9$  mmHg ( $p = 0,01$ ) (Abbildung 3.13). Die Kontraktionsgeschwindigkeit  $\Delta LVP / \Delta t_{max}$  stieg nur bei rAAV.VEGF-A/PDGF-B ( $1731 \pm 104$  mmHg/s) im Vergleich zu dem Placebo  $1337 \pm 67$  mmHg/s an (in Ruhe). In der VEGF-A Gruppe betrug sie  $1275 \pm 145$  mmHg/s (Abbildung 3.14). Die Relaxationsgeschwindigkeit war passend dazu. Hier maßen wir bei rAAV.VEGF-A/PDGF-B ein  $\Delta LVP / \Delta t_{min}$   $-1854 \pm 127$  mmHg/s, bei rAAV.VEGF-



**Abbildung 3.11:** Darstellung der durchschnittlichen Ejektionsfraktionen in den einzelnen Gruppen am Tag 28 und 56.



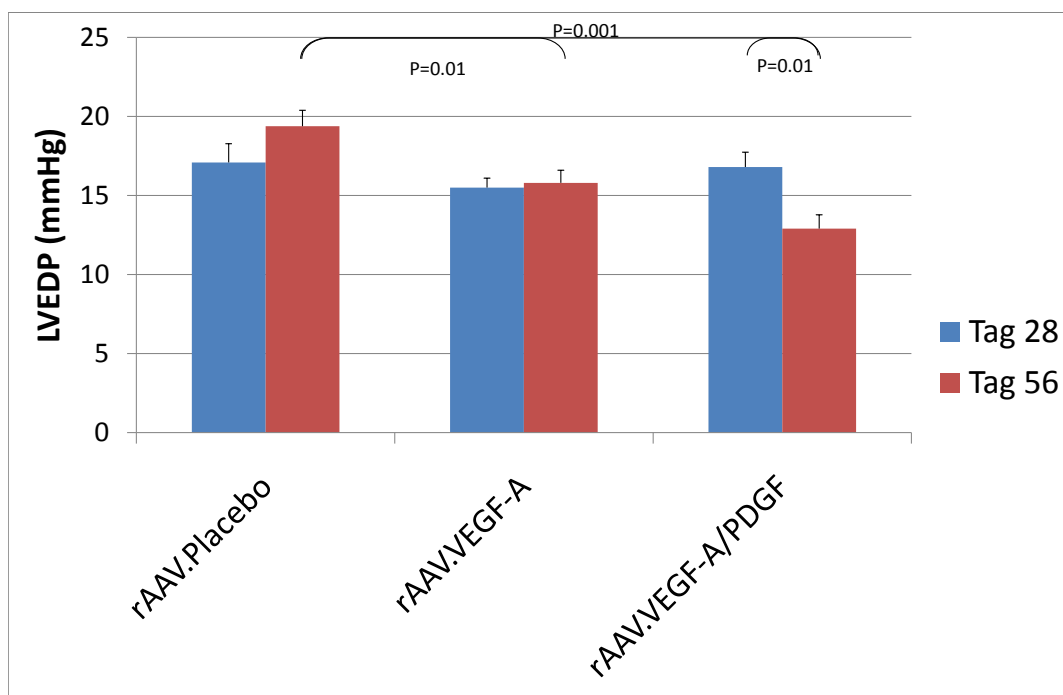
**Abbildung 3.12:** Darstellung der durchschnittlichen Relaxationsgeschwindigkeit in den einzelnen Gruppen bei Ruhebedingungen und unter Schrittmacherstimulation.

A  $-1080 \pm 89$  mmHg/s und bei dem Placebo  $-1206 \pm 174$  mmHg/s (Abbildung 3.12).

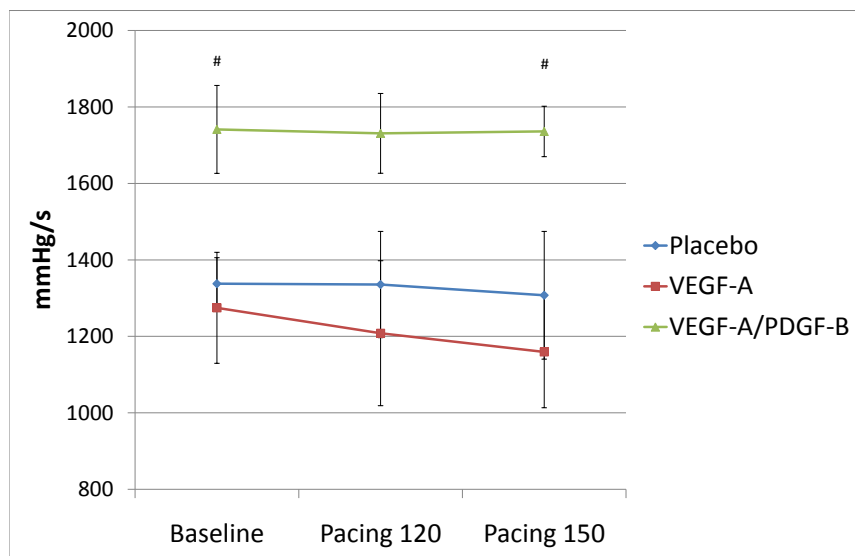
### 3.6 Die regionale myokardiale Funktion

In der Sonomikrometrie zeigte sich, dass die subendokardiale Segmentverkürzung (SES) in der Placebogruppe stark eingeschränkt war. Diese betrug in Ruhe  $40 \pm 7\%$  des nicht ischämischen Werts und sank mit steigender Herzfrequenz auf  $9 \pm 6\%$  (HF:150/min). Durch die Behandlung mit VEGF-A wurde dies nur nicht signifikant verändert ( $42 \pm 4\%$  (Ruhefrequenz) vs.  $24 \pm 4\%$  (HF:150/min,  $p < 0,05$ ). Andererseits kam es bei der Gruppe, die mit rAAV.VEGF-A/PDGF-B behandelt wurde, zu einer funktionellen Verbesserung. Hier lag die SES in Ruhe bei  $64 \pm 9\%$  ( $p = 0,07$  vs. Placebo und rAAV.VEGF-A) und bei einer Herzfrequenz von 150/min noch bei  $53 \pm 11\%$  ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 3.15).

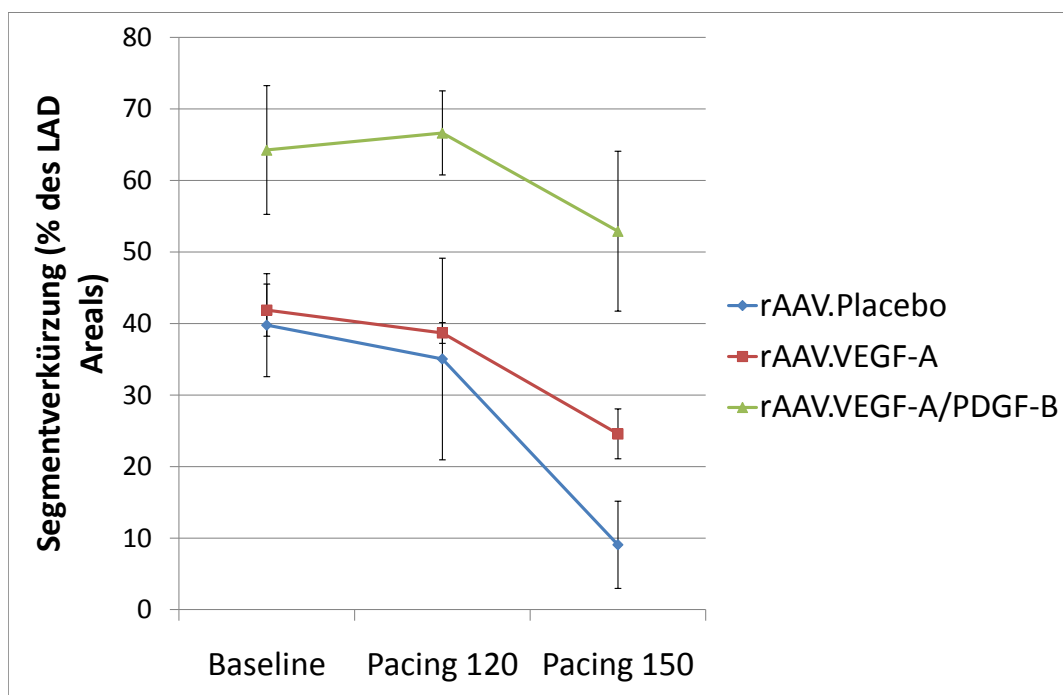




**Abbildung 3.13:** Darstellung des durchschnittlichen enddiastolische linksventrikuläre Drucks in den einzelnen Gruppen am Tag 28 und 56.



**Abbildung 3.14:** Darstellung der durchschnittlichen Kontraktionsgeschwindigkeit in den einzelnen Gruppen bei Ruhebedingungen und unter Schrittmacherstimulation.



**Abbildung 3.15:** Darstellung der regionalen Funktion im ischämischen Gebiet. Diese wurde in den einzelnen Versuchsgruppen mit der Sonomikrometrie gemessen.



# Kapitel 4

## Diskussion

Wir wollten die Möglichkeiten einer neuen Therapie für die Koronare Herzkrankheit bei no-option Patienten untersuchen. In unserem Tiermodell gaben wir Scheinen mit einer künstlichen Stenose des Ramus Circumflexus entweder VEGF oder VEGF-PDGF über die Koronarvene. Die Auswertung zeigte signifikante Effekte auf die im Folgendem näher eingegangen werden soll.

### 4.1 Tierexperimentelles Modell

Als Versuchsorganismen für die therapeutische Neovaskularisation am Herzen kommen theoretisch viele Tieremodelle in Betracht, unter anderem Primaten, Schweine, Kaninchen, Hunde, Ratten und Mäuse. Für die Transduktion von Gefäßwachstumsfaktoren liegt bereits viel Erfahrung mit diesen Tiermodellen vor. Jedoch wollten wir ein Modell benutzen, das auch in seiner praktischen Durchführbarkeit in hohem Maße auf den Menschen zu übertragen ist. Die kleinen Tiere kommen aufgrund unterschiedlicher Größenverhältnisse nicht in Frage. Primaten würden zwar ausgezeichnet mit dem menschlichen Körper zu vergleichen sein, jedoch besitzen Primaten ein Bewusstsein und daher besteht hier eine ethische Problematik. Schweine sind wegen der großen Übereinstimmung mit dem Menschen hinsichtlich der Koronaranatomie und -physiologie gut als

Modellorganismus geeignet. Sie besitzen, ähnlich wie der Mensch, ein koronares Dreigeßäßsystem und nur ein schwach ausgeprägtes Kollateralsystem (Schaper et al., 1967; Sjöquist et al., 1984; White und Bloor, 1981). Auch sind die Größe der Gefäße und des Herzens vergleichbar mit denen des Menschen, so dass man die in der Klinik eingesetzten Geräte und Pharmaka auch beim Schwein benutzen kann. Das führt insgesamt zu einer recht großen Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tierversuch auf das Szenario am Menschen. Daher entschieden wir uns dazu, als Modell einer chronischen myokardialen Ischämie Tiere der Rasse Deutsches Landschwein zu verwenden. Allerdings sind bei Patienten mit chronischer KHK die Koronarien atherosklerotisch verändert und die Patienten haben auch ein durchschnittliches Alter um die 60 Jahre, im Unterschied zu den jungen und gesunden Versuchstieren. Wir wollten die atherosklerotisch verengten Koronarien simulieren. Eine Möglichkeit dies zu erreichen ist der Ameroid-Quellring. Dabei wird während eines chirurgischen Eingriffs ein Ring um das zu untersuchende Gefäß platziert. Dieser quillt innerhalb von 3-4 Wochen auf und führt so zu einer zirkulären Stenose des Gefäßes in diesem Bereich (O’Konski et al., 1987; Tuzun et al., 2010). Das ist ein gutes und etabliertes Modell zur Induzierung von Koronararterienstenosen. Allerdings ist dafür eine Thorakotomie notwendig und damit ist diese Methode sowohl mit einem höherem Aufwand, mit mehr Komplikationen, unter anderem mit einem Reiz durch eine Entzündungsreaktion, und mit höherem Stress für die Tiere verbunden. Wir entschieden uns daher für die Implantation eines Reduktionsstents, ein etabliertes Verfahren um eine Stenose in einer Koronararterie auszulösen. Hierfür ist jedoch keine Operation notwendig, der Stent kann im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung schnell, sicher und mit minimalen Komplikationen platziert werden (von Degenfeld et al., 2003).

## 4.2 Nachweis des Gentransfers

In anderen Studien wurde oft die Effektivität des Adenovirus als Genvektor bei der therapeutischen Angiogenese untersucht. Dabei zeigte sich, dass es damit zu einer hohen Wachstumsrate

von Gefäßzellen kam, aber eben auch zu einer ausgeprägten Immunantwort, die eine erneute Anwendung im selben Tier ineffizient machte (Gruchala et al., 2004). Bei Adenoviren kam es im Tierexperiment zu unerwünschten Nebenwirkungen wie zum Beispiel peripheren Ödemen und ektopter Genexpression (Vajanto et al., 2002). In anderen Arbeiten wurde gezielt die Auswirkungen einer Überexpression von VEGF-A untersucht. Hier zeigte sich, dass es dadurch zur Bildung von Hämangiomen und zu Störungen der Reifung von neuen Gefäßen kommen kann (Springer et al., 1998; Masaki et al., 2002). Wenn VEGF-A nun aber mittels AAV transduziert wurde, kam es in den Hinterläufen von Ratten zu einer Stimulation der Angiogenese und dadurch zu einer Verbesserung der Durchblutung. Hierbei zeigte sich auch, dass die intramuskuläre Gabe effizient und stabil war. Jedoch kam es einerseits bei einer zu hohen Dosierung von VEGF-A leider auch zu einer ektopten Expression (Shimpo et al., 2002) und auf der anderen Seite bei einer zu niedrigen Dosierung zu keiner Verbesserung der Durchblutung (Kupatt et al., 2010). Dies liegt wahrscheinlich zum einen an einer inhomogenen VEGF-A-Expression, die zu einem ungeordneten Kapillarnetz führt (von Degenfeld et al., 2006) und zum anderen an der Inhibierung des PDGF-R $\beta$ -Signalwegs in glatten Gefäßmuskelzellen durch einen Komplex aus PDGF-R $\beta$  und VEGF-R2 (Greenberg et al., 2008).

Um die negativen Auswirkungen einer Überexpression von VEGF-A zu vermeiden, haben wir uns für eine relativ niedrige Dosis von VEGF-A entschieden ( $2 \times 10^{12}$  Viruspartikel für ein 40kg schweres Tier). Die dabei zu erwartende ungenügende Wirkung versuchten wir zu kompensieren, indem wir VEGF-A mit einem PDGF-B transduzierenden AAV kombinierten (Zymek et al., 2006; Lindahl et al., 1997; Schierling et al., 2009).

Da wiederum aber eine zu hohe Dosis von PDGF-B zu einer Restenose der Koronararterien führt (Levitzki, 2005), entschlossen wir uns für eine Dosis, die lediglich doppelt so hoch war wie die von VEGF-A ( $4 \times 10^{12}$  Viruspartikel rAAV.PDGF-B).

Vier Wochen nach der Behandlung konnten wir im Myokard eine erhöhte Expression sowohl von

VEGF-A als auch von PDGF-B nachweisen (Abb. 3.2 und Abb. 3.3). In diversen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass AAV zu einer langanhaltenden Expression von Genen führte. Wir wollten dies nun auch am Schwein für VEGF-A und PDGF-B nachweisen. In unserem Versuch war sowohl VEGF als auch PDGF vier Wochen nach der Retroinfusion über die Koronarvene eindeutig im Myokard nachweisbar. Bei rAAV.VEGF-A war die Expression von VEGF-A um 163%, im Vergleich zum rAAV.Placebo gesteigert. Bei rAAV.VEGF-A/PDGF-B war die Expression von VEGF-A um 88% und die von PDGF-B um 250% gegenüber rAAV.Placebo erhöht.

### 4.3 Angiogenese

Nachdem tierexperimentelle Studien vielversprechende Ergebnisse erbrachten, wurden auch klinische Studien zur therapeutischen Neovaskularisation durchgeführt. Losordo et al. zeigten in einer Phase I Studie an fünf Patienten, dass eine Injektion von reiner VEGF<sub>165</sub> cDNA in das Myokard die Angina Pectoris-Symptomatik reduzieren kann und zugleich sicher ist. Die Perfusion wurde mittels Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) und Koronarangiographie objektiviert. Dabei zeigte sich, dass sich sowohl in der SPECT die myokardiale Perfusion verbesserte als auch in der Angiographie der Rentrop-Score stieg, also die darstellbaren Gefäße von höherer Qualität waren (Losordo et al., 1998). Dieser Studie folgte eine placebokontrollierte doppelblinde Phase I/II Studie. Dabei wurde eine VEGF-2 Plasmid-DNA über einen Herzkatheter und nicht mehr direkt intramyokardial injiziert. Dabei kam es erneut zu einer deutlichen Besserung der Angina Pectoris-Symptomatik (Losordo et al., 2002). Diese guten Ergebnisse führten zu weiteren Studien, die auch die langfristigen Erfolge untersuchen wollten. Die NORTHERN Studie war eine placebokontrollierte doppelblinde Studie die die Veränderungen in der myokardialen Perfusion nach 3 und 6 Monaten mittels SPECT untersuchte. Jedoch zeigten sich hierbei nach intramyokardialer VEGF-A<sub>165</sub> Injektion keine Veränderungen (Stewart et al., 2009). In einer weiteren placebokontrollierten doppelblinden Phase II Studie wurde der Erfolg



eines virusvermittelten Gentransfers von Ad-VEGF<sub>165</sub> untersucht. Dabei wurden die Viren über einen Katheter appliziert. Es zeigte sich, dass die Perfusion auch nach 6 Monaten gesteigert blieb (Hedman et al., 2003). Passend dazu zeigte auch die REVASC Studie, eine randomisierte klinische Studie, dass es bei einer intramyokardialen Injektion von Ad-VEGF-121 transduzierenden Adenoviren zu einer besseren Erholung von einer belastungsinduzierter Ischämie kam (Stewart et al., 2006).

In Kontrast dazu zeigte die NOVA Studie, eine randomisierte Placebo kontrollierte Studie keine Verbesserung der Leistungsfähigkeit oder der myokardialen Perfusion. Hierbei wurden ebenfalls Adenoviren die VEGF-121 transduzierten intramyokardial injiziert (Kastrup et al., 2011). In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich sagen, dass VEGF in klinischen Studien keine einheitlich positiven Ergebnisse zeigte (Ylä-Herttuala, 2006).

Ein anderer Wachstumsfaktor der ebenfalls vielversprechende Ergebnisse in tierexperimentellen Studien lieferte, ist der Fibroblast Growth Factor (FGF). Besonders die Isoformen FGF-1, 2, 4 und 5 wurden in Angiogenesestudien untersucht (Javerzat et al., 2002; Giordano et al., 1996). In einem Großtiermodell am Schwein wurde die Wirkung von FGF-5 nach stressinduzierter Ischämie untersucht. Hierbei wurden FGF-5 transduzierende Adenoviren über einen Katheter intrakoronar appliziert. Nach 2 Wochen zeigten sich sowohl ein gesteigerter Blutfluss, eine höhere Kapillardichte als auch eine bessere Herzfunktion. Diese Ergebnisse wurden in vorklinischen Studien bei denen Ad5-FGF-4 intrakoronar appliziert wurde bestätigt (Grines et al., 2003). Diese guten Ergebnisse führten zu klinischen Studien die FGF am Patienten untersuchten. In der AGENT1 Studie wurde bei einer kleinen Patientenzahl Ad-FGF-4 intrakoronar gegeben. Das führte zu einer besseren Belastungsfähigkeit nach 4 Wochen (Grines et al., 2002). Allerdings konnten die Folgestudien AGENT 3/4 diese positiven Ergebnisse nicht bestätigen (Henry et al., 2007).

Bei unserem Experiment am Schwein zeigte sich, dass die VEGF-A Gabe zu einer Verdoppelung der Kapillaren führt (Abb. 3.4). Dies gilt sowohl für die alleinige Gabe von VEGF-A als auch für Kombination mit PDGF-B. Allerdings wurde hierbei VEGF-A auch fünffach höher dosiert als rAAV.VEGF-A/PDGF-B. Die Anzahl der Perizyten, die der Reifung und Stabilisierung der neugebildeten Kapillaren dienen, ließ sich bereits durch die VEGF-A-Gabe steigern. Bei der zusätzlichen Applikation von PDGF-B kam es zu einer noch stärker ausgeprägten Zunahme der Perizyten bei gleichbleibender Anzahl von Endothelzellen. Welche Auswirkungen hat nun die kombinierte Gabe von VEGF-A und PDGF-B auf die Arteriogenese und die Maturation?

#### 4.4 Arteriogenese und Maturation

Das Wachstum von neuen Kapillaren allein reicht für eine suffiziente und stabile Perfusion nicht aus. Entscheidend sind auch die Maturation dieser neuen Gefäße und das Wachstum von neuen Kollateralen. Mit VEGF alleine läßt sich keine ausreichende Angiogenese erreichen, da die neuen Gefäße unregelmäßig geformt und sehr undicht sind (Carmeliet und Collen, 1999). Ein weiterer Nachteil einer alleinigen VEGF Gabe ist, dass die neu gewachsenen Kapillaren nicht von Dauer sind und eine kontinuierliche Applikation von VEGF benötigen. Dies ist am ehesten auf die fehlende Maturierung zurückzuführen (Dor et al., 2002). Der genaue Mechanismus der Maturation ist noch nicht komplett verstanden. Allerdings scheint die Beschichtung der Kapillare mit Perizyten ein entscheidender früher Schritt in der Reifung zu Arteriolen zu sein (Gerhardt et al., 2003; Dor et al., 2002; Jain, 2003). Dies wird unter anderem durch PDGF erreicht. Dieser führt über Chemotaxis zu der Anlagerung von Perizyten. Eine Kombination aus VEGF und PDGF kann gleichzeitig sowohl die Neubildung als auch die Maturation von Gefäßen bewirken (Kupatt et al., 2010). Neben PDGF trägt auch Angiopoietin-1 zur Maturierung bei (Stratman et al. (2010); Suri et al. (1996); Arsic et al. (2003)). Für die Maturierung zu Arterien ist, im Gegenteil zur Angiogenese, nicht so sehr ein lokaler Sauerstoffmangel entscheidend, sondern vielmehr ein

Shear Stress (Schaper, 2009). Gefäße reagieren auf einen gesteigerten Shear-Stress mit Wachstum und Remodelling. Dabei wird der mechanische Reiz über Signalkaskaden in eine gesteigerte Expression von Genen, wie z.B. das für das Intercellular Cell Adhesion Molecule (ICAM) -1 und -2 auf Endothelzellen übertragen. An die ICAM können zirkulierende Monozyten über den MAC-Rezeptor binden und in das perivaskuläre Gewebe wandern. Dort können sie Zytokine abgeben, die noch mehr Monozyten anlocken und zum Wachstum von Endothel- und glatten Muskelzellen beitragen (Schirmer et al., 2009). Auch klinisch wurde versucht die Monozyten-vermittelte Arteriogenese zu steigern. In einer Studie wurde GM-CSF lokal in eine ischämische Extremität appliziert. Dabei kam es jedoch zu schweren Nebenwirkungen, unter anderem zum Akuten Koronarsyndrom (Zbinden et al., 2005). Wenn man versucht die Arteriogenese über Monozyten, also Entzündungszellen, zu vermitteln, birgt das momentan auch gleichzeitig das Risiko für eine gesteigerte Atherosklerose.

Ich möchte wieder zurück auf unser Experiment kommen. Als Korrelat einer suffizienten Arteriogenese und Maturation kann man die neu entstandenen Kollateralen und die NG2-positiven Kapillaren sehen. Die Kollateralen bewerteten wir an Koronarangiographien vom letzten Tag des Experiments. Deren Zahl ließ sich bereits durch VEGF-A verdoppeln, durch VEGF-A/PDGF-B sogar verdreifachen (Abb. 3.6). Wie hoch ist nun aber die Qualität dieser neuen Kollateralgefäße? Anhand des Rentrop Scores beurteilten wir die Füllung der Gefäße (Cohen und Rentrop, 1986). Hier zeigte sich, dass VEGF-A zu keinem signifikanten Effekt führte (Abb. 3.8). VEGF-A/PDGF-B hingegen führte nicht nur zu mehr Kollateralen, diese waren zudem auch besser durchgängig. Der positive Effekt auf die Kollateralisierung lässt sich durch zwei Dinge erklären. Zum einen könnte durch die verbesserte Mikrozirkulation der dadurch erhöhte Shear-Stress als wichtiger Faktor der Arteriogenese dazu führen (Eitenmüller et al., 2006), zum anderen könnte auch ein direkter Effekt von PDGF-B auf das Kollateralenwachstum dabei helfen (Schierling et al., 2009).

## 4.5 Die regionale myokardiale Perfusion

Zur Messung und Beurteilung der myokardialen Perfusion benutzten wir die Methode der Mikrosphären. Hierbei zeigte sich in Ruhe, dass VEGF-A eine Steigerung der Durchblutung im Vergleich zur ischämischen Kontrolle bewirken kann. Jedoch war die Steigerung im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant, im Unterschied zur VEGF-A/PDGF-B Gruppe (Abb. 3.9). Diese konnte nämlich die Durchblutung in Ruhe auf Werte steigern, die ähnlich dem im nicht-ischämischen Gebiet waren. Um zu sehen ob sich dieser Trend auch bei höheren Herzfrequenzen fortsetzte, führten wir die Messung nochmal bei einer Herzfrequenz von 150/min durch. Hierbei kam es erneut bereits durch VEGF-A zu einer nicht-signifikanten Steigerung der Durchblutung, wohingegen VEGF-A/PDGF-B die Durchblutung auf ungefähr 90% des nicht-ischämischen Areals anhob (Abbildung: 3.10). Es ließ sich also ausschließlich mit VEGF-A/PDGF-B eine signifikante Verbesserung der Perfusion erreichen.

Dabei ist anzumerken, dass in der VEGF Gruppe eine fünffach höhere Dosierung vorlag als in der VEGF-PDGF Gruppe und damit ist allerdings auch ein erhöhtes Risiko von ektopter Expression und unerwünschten Nebenwirkungen verbunden.

## 4.6 Die myokardiale Funktion

Welche Auswirkung hat dies alles auf die letztlich entscheidende Größe, die Herzfunktion?

Eine verminderte Herzfunktion führt in den meisten Fällen zu einer Herzinsuffizienz. Patienten mit diesem Krankheitsbild leiden unter Luftnot und haben nur eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit und Lebensqualität. 70% der Patienten versterben innerhalb von 5 Jahren an der Herzinsuffizienz beziehungsweise an Komplikationen wie Arrhythmien (Mosterd und Hoes, 2007). Wenn man nun die Herzfunktion durch zum Beispiel unseren Ansatz verbessern könnte, dann könnten diese Patienten sowohl bei der Lebensqualität als auch bei der Lebenserwartung profitieren.

Wir wollten zunächst die Veränderungen der globalen Funktion beurteilen. Sowohl die Kontraktions-

als auch die Relaxationsgeschwindigkeit waren bei der VEGF-A/PDGF-B Gruppe deutlich erhöht. Bei der VEGF-A Gruppe waren diese hingegen etwas vermindert (Abb. 3.14, 3.12). Als nächstes wollten wir die Druckverhältnisse im linken Ventrikel messen (Kapitel 2.5.3). Der links-ventrikuläre enddiastolische Druck, als wichtiges Maß für die Herzfunktion, stieg sowohl bei den Kontrollen als auch bei der VEGF-A Gruppe vier Wochen nach der Behandlung nicht-signifikant an. Bei der Gruppe mit VEGF-A/PDGF-B sank dieser jedoch signifikant von  $16,8 \pm 0,9$  auf  $12,9 \pm 0,9$  mmHg ab (Abb. 3.13). Welche Auswirkungen ließen sich bei der Ejektionsfraktion, einem wichtigen Prognoseparameter beobachten? Es zeigte sich, dass nur in der Gruppe mit VEGF-A/PDGF-B die Ejektionsfraktion gesteigert werden konnte (Abb. 3.11). Die kombinierte Gabe von VEGF-A und PDGF-B führte also in unserem Modell zu einer deutlichen Verbesserung der globalen myokardialen Funktion. Die Verbesserung der globalen Herzfunktion lässt sich auf eine Veränderung in der regionalen Funktion zurückführen. Diese lässt sich unter anderem durch die Messung der subendokardialen Segmentverkürzung beurteilen (Kapitel 2.5.4). Es gibt einen gut belegten Zusammenhang zwischen der myokardialen Perfusion und der regionalen Funktion (Stowe et al., 1978; Vatner, 1980). Das bedeutet auch, dass eine eingeschränkte Kontraktilität ein Hinweis auf eine eingeschränkte Perfusion darstellt. Die Methode der Sonomikrometrie beziehungsweise der Ultraschalllaufzeitmessung ermöglicht die Beurteilung der myokardialen Funktion mittels einem Paar Piezokristallen. Die subendokardiale Positionierung der Kristalle parallel zur kurzen und orthograd zur langen Herzachse hat sich als optimal für die Messung der myokardialen Funktion erwiesen (Hagl et al., 1976). Hier ließ sich durch VEGF-A ein Effekt erst bei Frequenzen über 120/min erkennen. VEGF-A/PDGF-B konnte zwar keine konstante subendokardialen Segmentverkürzung bei hohen Herzfrequenzen bewirken, aber die Werte lagen deutlich über denen der Kontrolle und der VEGF-A Gruppe.

## 4.7 Fazit

Wir untersuchten am Schweinemodell die Effektivität einer Gentherapie bei chronischer koronarer Herzerkrankung. Dafür benutzten wir pseudotypisierte adeno-assoziierte Viren, die die Expression von VEGF-A und PDGF-B verstärken sollten, um damit eine funktionell bedeutsame therapeutische Neovaskularisation auszulösen.

Wir konnten zeigen, dass die Kombination aus VEGF-A mit PDGF-B die Wirkung von VEGF-A übertrifft. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die mikrovaskuläre Reifung und das Kollateralenwachstum. VEGF-A plus PDGF-B führte zu einer signifikanten Zunahme der Perfusion und der Herzfunktion.

Da wir VEGF-A niedrig dosierten und keine Veränderung des VEGF-A-Spiegels im peripheren Blut messbar war, ist diese Methode unserer Ansicht nach sicher. Die Kombination aus VEGF-A mit PDGF-B und einem langwirksamen Genvektor könnte bei der Therapie von no-option Patienten mit chronischer koronarer Herzerkrankung von therapeutischem Nutzen sein.

# Zusammenfassung

Wir untersuchten die Auswirkungen einer AAV 2/9 vermittelten langanhaltenden Expression von VEGF-A und PDGF-B am porcinen Modell einer chronischen Myokardischämie. Dazu implantierten wir Reduktionsstents in den Ramus Circumflexus von 27 Schweinen. Dies führte bei 17 Tieren zu einer kompletten Okklusion der Arterie am Tag 28. Daraufhin retroinfundierten wir in die Koronarvene entweder rAAV.VEGF-A, rAAV.VEGF-A/PDGF-B oder rAAV.Placebo. Am Tag 28 und 56 untersuchten wir die Ejektionsfraktion und den linksventrikulären enddiastolischen Druck. Die Retroinfusion von rAAV.VEGF-A/PDGF-B erhöhte die regionale Blutflussreserve im Myokard und die Kollateralzahl. Mit rAAV.VEGF-A ließ sich weder die Flussreserve, noch die Kollateralzahl signifikant steigern. rAAV.VEGF-A/PDGF-B verbesserte die Ejektionsfraktion, im Gegensatz zu rAAV.VEGF-A. Die Retroinfusion von rAAV.VEGF-A induzierte Angiogenese, aber konnte weder das Kollateralenwachstum noch die Durchblutung steigern. Dies wurde erst durch die Kombination mit PDGF-B möglich. Zusätzlich zur Neovaskularisation konnte rAAV.VEGF-A/PDGF-B auch die regionale und globale Funktion im Hibernating Myokard steigern.





# Literaturverzeichnis

A. L. Baert, Christiaan Schiepers, K. Sartor: *Imaging Gene Expression: Concepts and Future Outlook*. Springer Berlin Heidelberg, 2006.

Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T. S., Cideciyan, A. V., Pearce-Kelling, S. E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A. M., Jacobson, S. G., Hauswirth, W. W. und Bennett, J.: Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. In: *Nat Genet*, Band 28(1):S. 92–95, 2001. doi:10.1038/88327. URL <http://dx.doi.org/10.1038/88327>.

Ambati, Balamurali K, Patterson, Emory, Jani, Pooja, Jenkins, Crystal, Higgins, Eric, Singh, Nirbhai, Suthar, Tushar, Vira, Nehali, Smith, Kimberly und Caldwell, Ruth: Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. In: *Br J Ophthalmol*, Band 91(4):S. 505–508, 2007. URL <http://dx.doi.org/10.1136/bjo.2006.107417>.

Annex, Brian H und Simons, Michael: Growth factor-induced therapeutic angiogenesis in the heart: protein therapy. In: *Cardiovasc Res*, Band 65(3):S. 649–655, 2005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.09.004>.

Arsic, Nikola, Zentilin, Lorena, Zacchigna, Serena, Santoro, Daniela, Stanta, Giorgio, Salvi, Alessandro, Sinagra, Gianfranco und Giacca, Mauro: Induction of functional neovasculari-

- zation by combined vegf and angiopoietin-1 gene transfer using aav vectors. In: *Mol Ther*, Band 7(4):S. 450–459, 2003.
- Assmann, Gerd, Cullen, Paul und Schulte, Helmut: Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular münster (procam) study. In: *Circulation*, Band 105(3):S. 310–315, 2002.
- Bates, David O, Cui, Tai-Gen, Doughty, Joanne M, Winkler, Matthias, Sugiono, Marto, Shields, Jacqueline D, Peat, Danielle, Gillatt, David und Harper, Steven J: Vegf165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. In: *Cancer Res*, Band 62(14):S. 4123–4131, 2002.
- Berns, K. I. und Giraud, C.: Biology of adeno-associated virus. In: *Curr Top Microbiol Immunol*, Band 218:S. 1–23, 1996.
- Betsholtz, C., Karlsson, L. und Lindahl, P.: Developmental roles of platelet-derived growth factors. In: *Bioessays*, Band 23(6):S. 494–507, 2001. doi:10.1002/bies.1069. URL <http://dx.doi.org/10.1002/bies.1069>.
- Betsholtz, Christer: Insight into the physiological functions of pdgf through genetic studies in mice. In: *Cytokine Growth Factor Rev*, Band 15(4):S. 215–228, 2004. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.005>.
- Bishayee, S., Majumdar, S., Khire, J. und Das, M.: Ligand-induced dimerization of the platelet-derived growth factor receptor. monomer-dimer interconversion occurs independent of receptor phosphorylation. In: *J Biol Chem*, Band 264(20):S. 11699–11705, 1989.
- Boekstegers, P., Diebold, J. und Weiss, C.: Selective ecg synchronised suction and retroinfusion of coronary veins: first results of studies in acute myocardial ischaemia in dogs. In: *Cardiovasc Res*, Band 24(6):S. 456–464, 1990.

- Boekstegers, P., Giehl, W., von Degenfeld, G. und Steinbeck, G.: Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 31(7):S. 1525–1533, 1998.
- Boekstegers, P., Peter, W., von Degenfeld, G., Nienaber, C. A., Abend, M., Rehders, T. C., Habazettl, H., Kapsner, T., von Lüdinghausen, M. und Werdan, K.: Preservation of regional myocardial function and myocardial oxygen tension during acute ischemia in pigs: comparison of selective synchronized suction and retroinfusion of coronary veins to synchronized coronary venous retroperfusion. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 23(2):S. 459–469, 1994.
- Boekstegers, P., von Degenfeld, G., Giehl, W., Heinrich, D., Hullin, R., Kupatt, C., Steinbeck, G., Baretton, G., Middeler, G., Katus, H. und Franz, W. M.: Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins. In: *Gene Ther*, Band 7(3):S. 232–240, 2000. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301079>.
- Brogi, E., Wu, T., Namiki, A. und Isner, J. M.: Indirect angiogenic cytokines upregulate vegf and bfgf gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates vegf expression only. In: *Circulation*, Band 90(2):S. 649–652, 1994.
- Bundesamt, Statistisches: 2009. URL <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt,templateId=renderPrint.psml>.
- Carmeliet, P. und Collen, D.: Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. In: *Curr Top Microbiol Immunol*, Band 237:S. 133–158, 1999.
- Carter, Barrie J: Adeno-associated virus vectors in clinical trials. In: *Hum Gene Ther*,

- Band 16(5):S. 541–550, 2005. doi:10.1089/hum.2005.16.541. URL <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2005.16.541>.
- Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Westermark, B. und Heldin, C. H.: Cloning and expression of human platelet-derived growth factor alpha and beta receptors. In: *Methods Enzymol*, Band 198:S. 72–77, 1991.
- Cohen, M. und Rentrop, K. P.: Limitation of myocardial ischemia by collateral circulation during sudden controlled coronary artery occlusion in human subjects: a prospective study. In: *Circulation*, Band 74(3):S. 469–476, 1986.
- Costantini, C., Sampaolesi, A., Serra, C. M., Pacheco, G., Neuburger, J., Conci, E. und Haendchen, R. V.: Coronary venous retroperfusion support during high risk angioplasty in patients with unstable angina: preliminary experience. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 18(1):S. 283–292, 1991.
- Danos, O.: Aav vectors for rna-based modulation of gene expression. In: *Gene Ther*, Band 15(11):S. 864–869, 2008. doi:10.1038/gt.2008.69. URL <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2008.69>.
- Das, Hiranmoy, George, Jon C, Joseph, Matthew, Das, Manjusri, Abdulhameed, Nasreen, Blitz, Anna, Khan, Mahmood, Sakthivel, Ramasamy, Mao, Hai-Quan, Hoit, Brian D, Kuppusamy, Periannan und Pompili, Vincent J: Stem cell therapy with overexpressed vegf and pdgf genes improves cardiac function in a rat infarct model. In: *PLoS One*, Band 4(10):S. e7325, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0007325. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007325>.
- Daynes, R. A., Dowell, T. und Araneo, B. A.: Platelet-derived growth factor is a potent biologic response modifier of t cells. In: *J Exp Med*, Band 174(6):S. 1323–1333, 1991.

- De, Bishnu, Heguy, Adriana, Leopold, Philip L, Wasif, Nabil, Korst, Robert J, Hackett, Neil R und Crystal, Ronald G: Intrapleural administration of a serotype 5 adeno-associated virus coding for alpha1-antitrypsin mediates persistent, high lung and serum levels of alpha1-antitrypsin. In: *Mol Ther*, Band 10(6):S. 1003–1010, 2004. doi:10.1016/j.ymthe.2004.08.022. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.022>.
- Dixelius, Johan, Makinen, Taija, Wirzenius, Maria, Karkkainen, Marika J, Wernstedt, Christer, Alitalo, Kari und Claesson-Welsh, Lena: Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (vegfr-3) heterodimerization with vegfr-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. In: *J Biol Chem*, Band 278(42):S. 40973–40979, 2003. doi:10.1074/jbc.M304499200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M304499200>.
- Dor, Yuval, Djonov, Valentin, Abramovitch, Rinat, Itin, Ahuva, Fishman, Glenn I, Carmeliet, Peter, Goelman, Gadi und Keshet, Eli: Conditional switching of vegf provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. In: *EMBO J*, Band 21(8):S. 1939–1947, 2002. doi:10.1093/emboj/21.8.1939. URL <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/21.8.1939>.
- Du, Lingling, Kido, Masakuni, Lee, Darwin V, Rabinowitz, Joseph E, Samulski, R. Jude, Jamieson, Stuart W, Weitzman, Matthew D und Thistlethwaite, Patricia A: Differential myocardial gene delivery by recombinant serotype-specific adeno-associated viral vectors. In: *Mol Ther*, Band 10(3):S. 604–608, 2004. doi:10.1016/j.ymthe.2004.06.110. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.06.110>.
- Duan, D., Yue, Y. und Engelhardt, J. F.: Expanding aav packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. In: *Mol Ther*, Band 4(4):S. 383–391, 2001. doi:10.1006/mthe.2001.0456. URL <http://dx.doi.org/10.1006/mthe.2001.0456>.
- Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M. und Dvorak, A. M.: Vascular permeability fac-

- tor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. In: *Am J Pathol*, Band 146(5):S. 1029–1039, 1995.
- Ebos, John M L, Bocci, Guido, Man, Shan, Thorpe, Philip E, Hicklin, Daniel J, Zhou, Danielle, Jia, Xiaohong und Kerbel, Robert S: A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. In: *Mol Cancer Res*, Band 2(6):S. 315–326, 2004.
- Eitenmüller, Inka, Volger, Oscar, Kluge, Alexander, Troidl, Kerstin, Barancik, Miroslav, Cai, Wei-Jun, Heil, Matthias, Pipp, Frederic, Fischer, Silvia, Horrevoets, Anton J G, Schmitz-Rixen, Thomas und Schaper, Wolfgang: The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. In: *Circ Res*, Band 99(6):S. 656–662, 2006. doi:10.1161/01.RES.0000242560.77512.dd. URL <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000242560.77512.dd>.
- Enquist, L. W., Krug, R. M., Racaniello, V. R., Skalka, A. M. und Flint, S. J.: *Principles Of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, And Control*. American Society Microbiology, 2003.
- Ezhilarasan, Ravesanker, Mohanam, Indra, Govindarajan, Kathiravan und Mohanam, Sanjeeva: Glioma cells suppress hypoxia-induced endothelial cell apoptosis and promote the angiogenic process. In: *Int J Oncol*, Band 30(3):S. 701–707, 2007.
- Fearon, William F, Ikeno, Fumiaki, Bailey, Lynn R, Hiatt, Bonnie L, Herity, Niall A, Carter, Andrew J, Fitzgerald, Peter J, Rezaee, Mehrdad, Yeung, Alan C und Yock, Paul G: Evaluation of high-pressure retrograde coronary venous delivery of fgf-2 protein. In: *Catheter Cardiovasc Interv*, Band 61(3):S. 422–428, 2004. doi:10.1002/ccd.10790. URL <http://dx.doi.org/10.1002/ccd.10790>.

- Fechner, Henry, Sipo, Isaac, Westermann, Dirk, Pinkert, Sandra, Wang, Xiaomin, Suckau, Lennart, Kurreck, Jens, Zeichhardt, Heinz, Müller, Oliver, Vetter, Roland, Erdmann, Volker, Tschöpe, Carsten und Poller, Wolfgang: Cardiac-targeted rna interference mediated by an aav9 vector improves cardiac function in coxsackievirus b3 cardiomyopathy. In: *J Mol Med*, Band 86(9):S. 987–997, 2008. doi:10.1007/s00109-008-0363-x. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-008-0363-x>.
- Feldman, L. J. und Steg, G.: Optimal techniques for arterial gene transfer. In: *Cardiovasc Res*, Band 35(3):S. 391–404, 1997.
- Ferrara, Napoleone, Gerber, Hans-Peter und LeCouter, Jennifer: The biology of vegf and its receptors. In: *Nat Med*, Band 9(6):S. 669–676, 2003. doi:10.1038/nm0603-669. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nm0603-669>.
- Fiandaca, Massimo, Forsayeth, John und Bankiewicz, Krystof: Current status of gene therapy trials for parkinson's disease. In: *Exp Neurol*, Band 209(1):S. 51–57, 2008. doi:10.1016/j.expneurol.2007.08.009. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.08.009>.
- Fredriksson, Linda, Li, Hong und Eriksson, Ulf: The pdgf family: four gene products form five dimeric isoforms. In: *Cytokine Growth Factor Rev*, Band 15(4):S. 197–204, 2004. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.007>.
- Freedman, Saul Benedict und Isner, Jeffrey M: Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. In: *Ann Intern Med*, Band 136(1):S. 54–71, 2002.
- French, B. A., Mazur, W., Ali, N. M., Geske, R. S., Finnigan, J. P., Rodgers, G. P., Roberts, R. und Raizner, A. E.: Percutaneous transluminal in vivo gene transfer by recombinant adenovirus in normal porcine coronary arteries, atherosclerotic arteries, and two models of coronary restenosis. In: *Circulation*, Band 90(5):S. 2402–2413, 1994a.

- French, B. A., Mazur, W., Geske, R. S. und Bolli, R.: Direct in vivo gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral vectors. In: *Circulation*, Band 90(5):S. 2414–2424, 1994b.
- Fruchart, Jean-Charles, Nierman, Melchior C, Stroes, Erik S G, Kastelein, John J P und Duriez, Patrick: New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. In: *Circulation*, Band 109(23 Suppl 1):S. III15–III19, 2004. URL <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000131513.33892.5b>.
- Gaffney, M. M., Hynes, S. O., Barry, F. und O'Brien, T.: Cardiovascular gene therapy: current status and therapeutic potential. In: *Br J Pharmacol*, Band 152(2):S. 175–188, 2007. doi:10.1038/sj.bjp.0707315. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707315>.
- Gao, Guang-Ping, Alvira, Mauricio R, Wang, Lili, Calcedo, Roberto, Johnston, Julie und Wilson, James M: Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 99(18):S. 11854–11859, 2002. doi:10.1073/pnas.182412299. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.182412299>.
- Gao, Guang-Ping, Lu, You, Sun, Xun, Johnston, Julie, Calcedo, Roberto, Grant, Rebecca und Wilson, James M: High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes. In: *J Virol*, Band 80(12):S. 6192–6194, 2006. doi:10.1128/JVI.00526-06. URL <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00526-06>.
- Gerber, H. P., Condorelli, F., Park, J. und Ferrara, N.: Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. flt-1, but not flk-1/kdr, is up-regulated by hypoxia. In: *J Biol Chem*, Band 272(38):S. 23659–23667, 1997.
- Gerhardt, Holger und Betsholtz, Christer: Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. In:



*Cell Tissue Res*, Band 314(1):S. 15–23, 2003. doi:10.1007/s00441-003-0745-x. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-003-0745-x>.

Gerhardt, Holger, Golding, Matthew, Fruttiger, Marcus, Ruhrberg, Christiana, Lundkvist, Andrea, Abramsson, Alexandra, Jeltsch, Michael, Mitchell, Christopher, Alitalo, Kari, Shima, David und Betsholtz, Christer: Vegf guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. In: *J Cell Biol*, Band 161(6):S. 1163–1177, 2003. doi:10.1083/jcb.200302047. URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200302047>.

Giordano, F. J., Ping, P., McKirnan, M. D., Nozaki, S., DeMaria, A. N., Dillmann, W. H., Mathieu-Costello, O. und Hammond, H. K.: Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. In: *Nat Med*, Band 2(5):S. 534–539, 1996.

Greenberg, Joshua I, Shields, David J, Barillas, Samuel G, Acevedo, Lisette M, Murphy, Eric, Huang, Jianhua, Scheppke, Lea, Stockmann, Christian, Johnson, Randall S, Angle, Niren und Cheresch, David A: A role for vegf as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. In: *Nature*, Band 456(7223):S. 809–813, 2008. doi:10.1038/nature07424. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature07424>.

Grines, Cindy, Rubanyi, Gabor M, Kleiman, Neal S, Marrott, Pran und Watkins, Matthew W: Angiogenic gene therapy with adenovirus 5 fibroblast growth factor-4 (ad5fgf-4): a new option for the treatment of coronary artery disease. In: *Am J Cardiol*, Band 92(9B):S. 24N–31N, 2003.

Grines, Cindy L, Watkins, Matthew W, Helmer, Greg, Penny, William, Brinker, Jeffrey, Marmur, Jonathan D, West, Andrew, Rade, Jeffery J, Marrott, Pran, Hammond, H. Kirk und Engler, Robert L: Angiogenic gene therapy (agent) trial in patients with stable angina pectoris. In: *Circulation*, Band 105(11):S. 1291–1297, 2002.

Gruchala, Marcin, Bhardwaj, Shalini, Pajusola, Katri, Roy, Himadri, Rissanen, Tuomas T, Kokina, Ilze, Kholová, Ivana, Markkanen, Johanna E, Rutanen, Juha, Heikura, Tommi, Alitalo, Kari, Büeler, Hansruedi und Ylä-Herttuala, Seppo: Gene transfer into rabbit arteries with adeno-associated virus and adenovirus vectors. In: *J Gene Med*, Band 6(5):S. 545–554, 2004. doi:10.1002/jgm.535. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jgm.535>.

Hacein-Bey-Abina, S., Kalle, C. Von, Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Deist, F. Le, Fischer, A. und Cavazzana-Calvo, M.: Lmo2-associated clonal t cell proliferation in two patients after gene therapy for scid-x1. In: *Science*, Band 302(5644):S. 415–419, 2003. doi:10.1126/science.1088547. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1088547>.

Hagl, S., Heimisch, W., Meisner, H., Erben, R., Baum, M., Mendler, N. und Sebening, F.: Direct measurement of papillary muscle dynamics in the intact canine left ventricle during acute coronary occlusion (author's transl). In: *Thoraxchir Vask Chir*, Band 24(4):S. 303–308, 1976.

Hao, Xiaojin, Månsson-Broberg, Agneta, Blomberg, Pontus, Dellgren, Göran, Siddiqui, Anwar J, Grinnemo, Karl-Henrik, Wärdell, Eva und Sylvén, Christer: Angiogenic and cardiac functional effects of dual gene transfer of vegf-a165 and pdgf-bb after myocardial infarction. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 322(1):S. 292–296, 2004. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.101. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.101>.

Harper, Steven J und Bates, David O: Vegf-a splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? In: *Nat Rev Cancer*, Band 8(11):S. 880–887, 2008. doi:10.1038/nrc2505. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2505>.

Hatori, N., Sjöquist, P. O., Regårdh, C. und Rydén, L.: Pharmacokinetic analysis of coronary sinus retroinfusion in pigs. ischemic myocardial concentrations in the left circumflex coronary arterial area using metoprolol as a tracer. In: *Cardiovasc Drugs Ther*, Band 5(6):S. 1005–1010, 1991.

Hedman, Marja, Hartikainen, Juha, Syväne, Mikko, Stjernvall, Joachim, Hedman, Antti, Kivellä, Antti, Vanninen, Esko, Mussalo, Hanna, Kauppila, Esa, Simula, Sakari, Närvänen, Outi, Rantala, Arto, Peuhkurinen, Keijo, Nieminen, Markku S, Laakso, Markku und Ylä-Herttuala, Seppo: Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase ii results of the kuopio angiogenesis trial (kat). In: *Circulation*, Band 107(21):S. 2677–2683, 2003. doi:10.1161/01.CIR.0000070540.80780.92. URL <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000070540.80780.92>.

Heldin, C. H., Ostman, A., Eriksson, A., Siegbahn, A., Claesson-Welsh, L. und Westermark, B.: Platelet-derived growth factor: isoform-specific signalling via heterodimeric or homodimeric receptor complexes. In: *Kidney Int*, Band 41(3):S. 571–574, 1992.

Heldin, C. H. und Westermark, B.: Signal transduction by the receptors for platelet-derived growth factor. In: *J Cell Sci*, Band 96 ( Pt 2):S. 193–196, 1990.

Heldin, C. H. und Westermark, B.: Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. In: *Physiol Rev*, Band 79(4):S. 1283–1316, 1999.

Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H. und Betsholtz, C.: Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. In: *J Cell Biol*, Band 153(3):S. 543–553, 2001.

Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A. und Betsholtz, C.: Role of pdgf-b and

- pdgfr-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. In: *Development*, Band 126(14):S. 3047–3055, 1999.
- Henry, Timothy D, Grines, Cindy L, Watkins, Matthew W, Dib, Nabil, Barbeau, Gerald, Morea-dith, Randall, Andrasfay, Tony und Engler, Robert L: Effects of ad5fgf-4 in patients with angina: an analysis of pooled data from the agent-3 and agent-4 trials. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 50(11):S. 1038–1046, 2007. doi:10.1016/j.jacc.2007.06.010. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2007.06.010>.
- Hinkel, Rabea, El-Aouni, Chiraz, Olson, Tonia, Horstkotte, Jan, Mayer, Stefan, Müller, Sebastian, Willhauck, Michael, Spitzweg, Christine, Gildehaus, Franz-Josef, Münzing, Wolfgang, Hannappel, Ewald, Bock-Marquette, Ildiko, DiMaio, J. Michael, Hatzopoulos, Antonis K, Boekstegers, Peter und Kupatt, Christian: Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection. In: *Circulation*, Band 117(17):S. 2232–2240, 2008. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.758904. URL <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.758904>.
- Hinkel, Rabea, Trenkwalder, Teresa und Kupatt, Christian: Gene therapy for ischemic heart disease. In: *Expert Opin Biol Ther*, Band 11(6):S. 723–737, 2011. doi:10.1517/14712598.2011.570749. URL <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2011.570749>.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. und Shibuya, M.: Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 95(16):S. 9349–9354, 1998.
- Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A., Beck, L. H., Smith, S. R. und D'Amore, P. A.: Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-bb and heterotypic cell contact. In: *Circ Res*, Band 84(3):S. 298–305, 1999.

- Holmes, Katherine, Roberts, Owain LI, Thomas, Angharad M und Cross, Michael J: Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. In: *Cell Signal*, Band 19(10):S. 2003–2012, 2007. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.05.013>.
- Inagaki, Katsuya, Fuess, Sally, Storm, Theresa A, Gibson, Gregory A, Mctiernan, Charles F, Kay, Mark A und Nakai, Hiroyuki: Robust systemic transduction with aav9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of aav8. In: *Mol Ther*, Band 14(1):S. 45–53, 2006. doi:10.1016/j.ymthe.2006.03.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.014>.
- Isner, Jeffrey M: Myocardial gene therapy. In: *Nature*, Band 415(6868):S. 234–239, 2002. doi:10.1038/415234a. URL <http://dx.doi.org/10.1038/415234a>.
- Jain, Rakesh K: Molecular regulation of vessel maturation. In: *Nat Med*, Band 9(6):S. 685–693, 2003. doi:10.1038/nm0603-685. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nm0603-685>.
- Jakobsson, Lars, Kreuger, Johan, Holmborn, Katarina, Lundin, Lars, Eriksson, Inger, Kjellén, Lena und Claesson-Welsh, Lena: Heparan sulfate in trans potentiates vegfr-mediated angiogenesis. In: *Dev Cell*, Band 10(5):S. 625–634, 2006. doi:10.1016/j.devcel.2006.03.009. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.009>.
- Javerzat, Sophie, Auguste, Patrick und Bikfalvi, Andreas: The role of fibroblast growth factors in vascular development. In: *Trends Mol Med*, Band 8(10):S. 483–489, 2002.
- Jayandharan, G. R., Zhong, L., Li, B., Kachniarz, B. und Srivastava, A.: Strategies for improving the transduction efficiency of single-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. In: *Gene Ther*, Band 15(18):S. 1287–1293, 2008. doi:10.1038/gt.2008.89. URL <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2008.89>.

- Kar, S., Drury, J. K., Hajduczki, I., Eigler, N., Wakida, Y., Litvack, F., Buchbinder, N., Marcus, H., Nordlander, R. und Corday, E.: Synchronized coronary venous retroperfusion for support and salvage of ischemic myocardium during elective and failed angioplasty. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 18(1):S. 271–282, 1991.
- Kastrup, Jens, Jørgensen, Erik, Fuchs, Shmuel, Nikol, Sigrid, Bøtker, Hans Erik, Gyöngyösi, Mariann, Glogar, Dietmar und Kornowski, Ran: A randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of the safety and efficacy of biobypass (adgvvegfl21.10nh) gene therapy in patients with refractory advanced coronary artery disease: the nova trial. In: *EuroIntervention*, Band 6(7):S. 813–818, 2011. doi:10.4244/EIJV6I7A140. URL <http://dx.doi.org/10.4244/EIJV6I7A140>.
- Kawamura, Harukiyo, Li, Xiujuan, Harper, Steven J, Bates, David O und Claesson-Welsh, Lena: Vascular endothelial growth factor (vegf)-a165b is a weak in vitro agonist for vegf receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. In: *Cancer Res*, Band 68(12):S. 4683–4692, 2008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6577. URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6577>.
- Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V., Larson, P. J., Couto, L. B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A. J., Tai, S. J., Herzog, R. W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W. und High, K. A.: Evidence for gene transfer and expression of factor ix in haemophilia b patients treated with an aav vector. In: *Nat Genet*, Band 24(3):S. 257–261, 2000. doi:10.1038/73464. URL <http://dx.doi.org/10.1038/73464>.
- Kendall, R. L. und Thomas, K. A.: Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 90(22):S. 10705–10709, 1993.
- Knippers, Rolf: *Molekulare Genetik*. Thieme, 2006.

- Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M. und Berns, K. I.: Site-specific integration by adeno-associated virus. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 87(6):S. 2211–2215, 1990.
- Kumar, Arun H S und Caplice, Noel M: Clinical potential of adult vascular progenitor cells. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Band 30(6):S. 1080–1087, 2010. doi:10.1161/ATVBAHA.109.198895. URL <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.198895>.
- Kupatt, Christian: The vascular compartments of neovascularization: spotlight on the microcirculation. In: *Curr Pharm Biotechnol*, Band 8(1):S. 27–33, 2007.
- Kupatt, Christian, Hinkel, Rabea, Pfosser, Achim, El-Aouni, Chiraz, Wuchrer, Alexander, Fritz, Andrea, Globisch, Franziska, Thormann, Michael, Horstkotte, Jan, Lebherz, Corinna, Thein, Eckart, Banfi, Andrea und Boekstegers, Peter: Cotransfection of vascular endothelial growth factor-a and platelet-derived growth factor-b via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 56(5):S. 414–422, 2010. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.050. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2010.03.050>.
- Kupatt, Christian, Hinkel, Rabea, von Brühl, Marie-Luise, Pohl, Tilmann, Horstkotte, Jan, Raake, Philip, Aouni, Chiraz El, Thein, Eckehard, Dimmeler, Stefanie, Feron, Olivier und Boekstegers, Peter: Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 49(14):S. 1575–1584, 2007. doi:10.1016/j.jacc.2006.11.047. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2006.11.047>.
- Lampugnani, Maria Grazia, Zanetti, Adriana, Corada, Monica, Takahashi, Takamune, Balconi, Giovanna, Breviario, Ferruccio, Orsenigo, Fabrizio, Cattelino, Anna, Kemler, Rolf, Daniel, Thomas O und Dejana, Elisabetta: Contact inhibition of vegf-induced proliferation requires

- vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase dep-1/cd148. In: *J Cell Biol*, Band 161(4):S. 793–804, 2003. doi:10.1083/jcb.200209019. URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200209019>.
- Levitcki, Alexander: Pdgf receptor kinase inhibitors for the treatment of restenosis. In: *Cardiovasc Res*, Band 65(3):S. 581–586, 2005. doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.08.008>.
- Li, Xuri, Tjwa, Marc, Moons, Lieve, Fons, Pierre, Noel, Agnes, Ny, Anneli, Zhou, Jian Min, Lennartsson, Johan, Li, Hong, Luttun, Aernout, Pontén, Annica, Devy, Laetitia, Bouché, Ann, Oh, Hideyasu, Manderveld, Ann, Blacher, Silvia, Communi, David, Savi, Pierre, Bono, Françoise, Dewerchin, Mieke, Foidart, Jean-Michel, Autiero, Monica, Herbert, Jean-Marc, Collen, D., Heldin, Carl-Henrik, Eriksson, Ulf und Carmeliet, Peter: Revascularization of ischemic tissues by pdgf-cc via effects on endothelial cells and their progenitors. In: *J Clin Invest*, Band 115(1):S. 118–127, 2005. doi:10.1172/JCI19189. URL <http://dx.doi.org/10.1172/JCI19189>.
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P. und Betsholtz, C.: Pericyte loss and microaneurysm formation in pdgf-b-deficient mice. In: *Science*, Band 277(5323):S. 242–245, 1997.
- Losordo, D. W., Vale, P. R., Symes, J. F., Dunnington, C. H., Esakof, D. D., Maysky, M., Ashare, A. B., Lathi, K. und Isner, J. M.: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phveg165 as sole therapy for myocardial ischemia. In: *Circulation*, Band 98(25):S. 2800–2804, 1998.
- Losordo, Douglas W, Vale, Peter R, Hendel, Robert C, Milliken, Charles E, Fortuin, F. David, Cummings, Nancie, Schatz, Richard A, Asahara, Takayuki, Isner, Jeffrey M und Kuntz, Richard E: Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vas-



cular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. In: *Circulation*, Band 105(17):S. 2012–2018, 2002.

Lu, Yang: Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy—a review. In: *Stem Cells Dev*, Band 13(1):S. 133–145, 2004. doi:10.1089/154732804773099335. URL <http://dx.doi.org/10.1089/154732804773099335>.

Luttun, Aernout und Carmeliet, Peter: De novo vasculogenesis in the heart. In: *Cardiovasc Res*, Band 58(2):S. 378–389, 2003.

Manno, Catherine S, Chew, Amy J, Hutchison, Sylvia, Larson, Peter J, Herzog, Roland W, Arruda, Valder R, Tai, Shing Jen, Ragni, Margaret V, Thompson, Arthur, Ozelo, Margareth, Couto, Linda B, Leonard, Debra G B, Johnson, Frederick A, McClelland, Alan, Scallan, Ciaran, Skarsgard, Erik, Flake, Alan W, Kay, Mark A, High, Katherine A und Glader, Bertil: Aav-mediated factor ix gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia b. In: *Blood*, Band 101(8):S. 2963–2972, 2003. doi:10.1182/blood-2002-10-3296. URL <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-10-3296>.

Markkanen, Johanna E, Rissanen, Tuomas T, Kivelä, Antti und Ylä-Herttuala, Seppo: Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart—gene therapy. In: *Cardiovasc Res*, Band 65(3):S. 656–664, 2005. doi:10.1016/j.cardiores.2004.10.030. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.10.030>.

Masaki, Ichiro, Yonemitsu, Yoshikazu, Yamashita, Akihisa, Sata, Shihoko, Tanii, Mitsugu, Komori, Kimihiro, Nakagawa, Kazunori, Hou, Xiaogang, Nagai, Yoshiyuki, Hasegawa, Mamoru, Sugimachi, Keizo und Sueishi, Katsuo: Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. In: *Circ Res*, Band 90(9):S. 966–973, 2002.

- Mattila, Elina, Auvinen, Kaisa, Salmi, Marko und Ivaska, Johanna: The protein tyrosine phosphatase tcptp controls vegfr2 signalling. In: *J Cell Sci*, Band 121(Pt 21):S. 3570–3580, 2008. doi:10.1242/jcs.031898. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.031898>.
- McCarty, D. M., Monahan, P. E. und Samulski, R. J.: Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scaav) vectors promote efficient transduction independently of dna synthesis. In: *Gene Ther*, Band 8(16):S. 1248–1254, 2001. doi:10.1038/sj.gt.3301514. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301514>.
- Meerbaum, S., Lang, T. W., Osher, J. V., Hashimoto, K., Lewis, G. W., Feldstein, C. und Corday, E.: Diastolic retroperfusion of acutely ischemic myocardium. In: *Am J Cardiol*, Band 37(4):S. 588–598, 1976.
- Mikkers, Harald und Berns, Anton: Retroviral insertional mutagenesis: tagging cancer pathways. In: *Adv Cancer Res*, Band 88:S. 53–99, 2003.
- Miyagi, Naoto, Rao, Vinay P, Ricci, Davide, Du, Zeji, Byrne, Guerard W, Bailey, Kent R, Nakai, Hiroyuki, Russell, Stephen J und McGregor, Christopher G A: Efficient and durable gene transfer to transplanted heart using adeno-associated virus 9 vector. In: *J Heart Lung Transplant*, Band 27(5):S. 554–560, 2008. doi:10.1016/j.healun.2008.01.025. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2008.01.025>.
- Miyazaki, A., Hatori, N., Tadokoro, H., Rydén, L., Corday, E. und Drury, J.: More rapid thrombolysis with coronary venous retroinfusion of streptokinase compared with intravenous administration. an experimental study in canines. In: *Eur Heart J*, Band 11(10):S. 936–944, 1990.
- Mohl, W., Glogar, D. H., Mayr, H., Losert, U., Sochor, H., Pachinger, O., Kaindl, F. und Wolner, E.: Reduction of infarct size induced by pressure-controlled intermittent coronary sinus occlusion. In: *Am J Cardiol*, Band 53(7):S. 923–928, 1984.

- Montini, Eugenio, Cesana, Daniela, Schmidt, Manfred, Sanvito, Francesca, Bartholomae, Cynthia C, Ranzani, Marco, Benedicenti, Fabrizio, Sergi, Lucia Sergi, Ambrosi, Alessandro, Ponzoni, Maurilio, Doglioni, Claudio, Serio, Clelia Di, von Kalle, Christof und Naldini, Luigi: The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of hsc gene therapy. In: *J Clin Invest*, Band 119(4):S. 964–975, 2009. doi:10.1172/JCI37630. URL <http://dx.doi.org/10.1172/JCI37630>.
- Mosterd, Arend und Hoes, Arno W: Clinical epidemiology of heart failure. In: *Heart*, Band 93(9):S. 1137–1146, 2007. doi:10.1136/hrt.2003.025270. URL <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2003.025270>.
- Mueller, C. und Flotte, T. R.: Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. In: *Gene Ther*, Band 15(11):S. 858–863, 2008. doi:10.1038/gt.2008.68. URL <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2008.68>.
- Mukherjee, D., Bhatt, D. L., Roe, M. T., Patel, V. und Ellis, S. G.: Direct myocardial revascularization and angiogenesis—how many patients might be eligible? In: *Am J Cardiol*, Band 84(5):S. 598–600, A8, 1999. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149\(99\)00387-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149(99)00387-2).
- Muzyczka, N.: Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. In: *Curr Top Microbiol Immunol*, Band 158:S. 97–129, 1992.
- Nabel, E. G., Plautz, G. und Nabel, G. J.: Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. In: *Science*, Band 249(4974):S. 1285–1288, 1990.
- Nakai, Hiroyuki, Fuess, Sally, Storm, Theresa A, ichi Muramatsu, Shin, Nara, Yuko und Kay, Mark A: Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. In: *J Virol*, Band 79(1):S. 214–224, 2005. doi:10.1128/JVI.79.1.214-224.2005. URL <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.1.214-224.2005>.

- Nilsson, Ingrid, Rolny, Charlotte, Wu, Yan, Pytowski, Bronislaw, Hicklin, Dan, Alitalo, Kari, Claesson-Welsh, Lena und Wennström, Stefan: Vascular endothelial growth factor receptor-3 in hypoxia-induced vascular development. In: *FASEB J*, Band 18(13):S. 1507–1515, 2004. doi:10.1096/fj.03-1276com. URL <http://dx.doi.org/10.1096/fj.03-1276com>.
- O’Byrne, G. T., Nienaber, C. A., Miyazaki, A., Araujo, L., Fishbein, M. C., Corday, E. und Schelbert, H. R.: Positron emission tomography demonstrates that coronary sinus retroperfusion can restore regional myocardial perfusion and preserve metabolism. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 18(1):S. 257–270, 1991.
- Oh, B. H., Volpini, M., Kambayashi, M., Murata, K., Rockman, H. A., Kassab, G. S. und Ross, J.: Myocardial function and transmural blood flow during coronary venous retroperfusion in pigs. In: *Circulation*, Band 86(4):S. 1265–1279, 1992.
- O’Konski, M. S., White, F. C., Longhurst, J., Roth, D. und Bloor, C. M.: Ameroid constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine. a model of limited coronary collateral circulation. In: *Am J Cardiovasc Pathol*, Band 1(1):S. 69–77, 1987.
- Olsson, Anna-Karin, Dimberg, Anna, Kreuger, Johan und Claesson-Welsh, Lena: Vegf receptor signalling - in control of vascular function. In: *Nat Rev Mol Cell Biol*, Band 7(5):S. 359–371, 2006. doi:10.1038/nrm1911. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1911>.
- Pacak, Christina A, Mah, Cathryn S, Thattaliyath, Bijoy D, Conlon, Thomas J, Lewis, Melissa A, Cloutier, Denise E, Zolotukhin, Irene, Tarantal, Alice F und Byrne, Barry J: Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. In: *Circ Res*, Band 99(4):S. e3–e9, 2006. doi:10.1161/01.RES.0000237661.18885.f6. URL <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000237661.18885.f6>.
- Palomeque, J., Chemaly, E. R., Colosi, P., Wellman, J. A., Zhou, S., Monte, F. Del und Hajjar, R. J.: Efficiency of eight different aav serotypes in transducing rat myocardium in vivo. In:

- Gene Ther*, Band 14(13):S. 989–997, 2007. doi:10.1038/sj.gt.3302895. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302895>.
- Papetti, Michael und Herman, Ira M: Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. In: *Am J Physiol Cell Physiol*, Band 282(5):S. C947–C970, 2002. URL <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001>.
- Perrin, R. M., Konopatskaya, O., Qiu, Y., Harper, S., Bates, D. O. und Churchill, A. J.: Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. In: *Diabetologia*, Band 48(11):S. 2422–2427, 2005. doi:10.1007/s00125-005-1951-8. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-005-1951-8>.
- Pohl, Tilmann, Giehl, Wolfgang, Reichart, Bruno, Kupatt, Christian, Raake, Philip, Paul, Stefan, Reichenspurner, Hermann, Steinbeck, Gerhard und Boekstegers, Peter: Retroinfusion-supported stenting in high-risk patients for percutaneous intervention and bypass surgery: results of the prospective randomized myoprotec i study. In: *Catheter Cardiovasc Interv*, Band 62(3):S. 323–330, 2004. doi:10.1002/ccd.20060. URL <http://dx.doi.org/10.1002/ccd.20060>.
- Pugh, Christopher W und Ratcliffe, Peter J: Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the hif system. In: *Nat Med*, Band 9(6):S. 677–684, 2003. doi:10.1038/nm0603-677. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nm0603-677>.
- Raake, P. W., Hinkel, R., Müller, S., Delker, S., Kreuzpointner, R., Kupatt, C., Katus, H. A., Kleinschmidt, J. A., Boekstegers, P. und Müller, O. J.: Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (aav) vectors. In: *Gene Ther*, Band 15(1):S. 12–17, 2008. doi:10.1038/sj.gt.3303035. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3303035>.

- Raake, Philip, von Degenfeld, Georges, Hinkel, Rabea, Vachenaue, Robert, Sandner, Torleif, Beller, Sabrina, Andrees, Martin, Kupatt, Christian, Schuler, Gerhard und Boekstegers, Peter: Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 44(5):S. 1124–1129, 2004. doi:10.1016/j.jacc.2004.05.074. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2004.05.074>.
- Rabinowitz, J. E. und Samulski, R. J.: Building a better vector: the manipulation of aav virions. In: *Virology*, Band 278(2):S. 301–308, 2000. doi:10.1006/viro.2000.0707. URL <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2000.0707>.
- Rajashekhar, Gangaraju, Willuweit, Antje, Patterson, Carolyn E, Sun, Peichuan, Hilbig, Andreas, Breier, Georg, Helisch, Armin und Clauss, Matthias: Continuous endothelial cell activation increases angiogenesis: evidence for the direct role of endothelium linking angiogenesis and inflammation. In: *J Vasc Res*, Band 43(2):S. 193–204, 2006. doi:10.1159/000090949. URL <http://dx.doi.org/10.1159/000090949>.
- Red-Horse, Kristy, Ueno, Hiroo, Weissman, Irving L und Krasnow, Mark A: Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. In: *Nature*, Band 464(7288):S. 549–553, 2010. doi:10.1038/nature08873. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature08873>.
- Rothmann, T., Katus, H. A., Hartong, R., Perricaudet, M. und Franz, W. M.: Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus. In: *Gene Ther*, Band 3(10):S. 919–926, 1996.
- Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N. und Hunter, L. A.: Targeted integration of adeno-associated virus (aav) into human chromosome 19. In: *EMBO J*, Band 10(12):S. 3941–3950, 1991.

- Sarkar, Rita, Mucci, Melinda, Addya, Sankar, Tetreault, Renee, Bellinger, Dwight A, Nichols, Timothy C und Kazazian, Haig H: Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia a dogs and mice. In: *Hum Gene Ther*, Band 17(4):S. 427–439, 2006. doi:10.1089/hum.2006.17.427. URL <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2006.17.427>.
- Schaper, W. und Buschmann, I.: Arteriogenesis, the good and bad of it. In: *Eur Heart J*, Band 20(18):S. 1297–1299, 1999. URL <http://dx.doi.org/10.1053/euhj.1999.1686>.
- Schaper, W., Jageneau, A. und Xhonneux, R.: The development of collateral circulation in the pig and dog heart. In: *Cardiologia*, Band 51(6):S. 321–335, 1967.
- Schaper, Wolfgang: Collateral circulation: past and present. In: *Basic Res Cardiol*, Band 104(1):S. 5–21, 2009. doi:10.1007/s00395-008-0760-x. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-008-0760-x>.
- Schierling, Wilma, Troidl, Kerstin, Troidl, Christian, Schmitz-Rixen, Thomas, Schaper, Wolfgang und Eitenmüller, Inka K: The role of angiogenic growth factors in arteriogenesis. In: *J Vasc Res*, Band 46(4):S. 365–374, 2009. doi:10.1159/000189797. URL <http://dx.doi.org/10.1159/000189797>.
- Schirmer, S. H., van Nooijen, F. C., Piek, J. J. und van Royen, N.: Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. In: *Heart*, Band 95(3):S. 191–197, 2009. doi:10.1136/hrt.2007.136119. URL <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2007.136119>.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S. und Dvorak, H. F.: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. In: *Science*, Band 219(4587):S. 983–985, 1983.
- Shimpo, Masahisa, Ikeda, Uichi, Maeda, Yoshikazu, Takahashi, Masafumi, Miyashita, Hiroshi,

- Mizukami, Hiroaki, Urabe, Masashi, Kume, Akihiro, Takizawa, Toshihiro, Shibuya, Masabumi, Ozawa, Keiya und Shimada, Kazuyuki: Aav-mediated vegf gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. In: *Cardiovasc Res*, Band 53(4):S. 993–1001, 2002.
- Siegbahn, A., Hammacher, A., Westermarck, B. und Heldin, C. H.: Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. In: *J Clin Invest*, Band 85(3):S. 916–920, 1990. doi:10.1172/JCI114519. URL <http://dx.doi.org/10.1172/JCI114519>.
- Simons, M., Bonow, R. O., Chronos, N. A., Cohen, D. J., Giordano, F. J., Hammond, H. K., Laham, R. J., Li, W., Pike, M., Sellke, F. W., Stegmann, T. J., Udelson, J. E. und Rosengart, T. K.: Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. In: *Circulation*, Band 102(11):S. E73–E86, 2000.
- Sjöquist, P. O., Duker, G. und Almgren, O.: Distribution of the collateral blood flow at the lateral border of the ischemic myocardium after acute coronary occlusion in the pig and the dog. In: *Basic Res Cardiol*, Band 79(2):S. 164–175, 1984.
- Springer, M. L., Chen, A. S., Kraft, P. E., Bednarski, M. und Blau, H. M.: Vegf gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. In: *Mol Cell*, Band 2(5):S. 549–558, 1998.
- Steg, P. G., Feldman, L. J., Scoazec, J. Y., Tahlil, O., Barry, J. J., Boulechfar, S., Ragot, T., Isner, J. M. und Perricaudet, M.: Arterial gene transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of an adenoviral vector. In: *Circulation*, Band 90(4):S. 1648–1656, 1994.
- Stewart, D. J., Hilton, J. D., Arnold, J. M O, Gregoire, J., Rivard, A., Archer, S. L., Charbonneau, F., Cohen, E., Curtis, M., Buller, C. E., Mendelsohn, F. O., Dib, N., Page, P., Ducas, J., Plante, S., Sullivan, J., Macko, J., Rasmussen, C., Kessler, P. D. und Rasmussen, H. S.:



- Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of advegf(121) (advegf121) versus maximum medical treatment. In: *Gene Ther*, Band 13(21):S. 1503–1511, 2006. doi:10.1038/sj.gt.3302802. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302802>.
- Stewart, Duncan J, Kutryk, Michael J B, Fitchett, David, Freeman, Michael, Camack, Nancy, Su, Yinghua, Siega, Anthony Della, Bilodeau, Luc, Burton, Jeffrey R, Proulx, Guy, Radhakrishnan, Sam und Investigators, N. O. R. T. H. E. R. N. Trial: Vegf gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the northern trial. In: *Mol Ther*, Band 17(6):S. 1109–1115, 2009. doi:10.1038/mt.2009.70. URL <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2009.70>.
- Stowe, D. F., Mathey, D. G., Moores, W. Y., Glantz, S. A., Townsend, R. M., Kabra, P., Chatterjee, K., Parmley, W. W. und Tyberg, J. V.: Segment stroke work and metabolism depend on coronary blood flow in the pig. In: *Am J Physiol*, Band 234(5):S. H597–H607, 1978.
- Stratman, Amber N, Schwindt, Amy E, Malotte, Kristine M und Davis, George E: Endothelial-derived pdgf-bb and hb-egf coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. In: *Blood*, Band 116(22):S. 4720–4730, 2010. doi:10.1182/blood-2010-05-286872. URL <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-05-286872>.
- Suarez, S. Cébe, Pieren, M., Cariolato, L., Arn, S., Hoffmann, U., Bogucki, A., Manlius, C., Wood, J. und Ballmer-Hofer, K.: A vegf-a splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through vegfr-2. In: *Cell Mol Life Sci*, Band 63(17):S. 2067–2077, 2006. doi:10.1007/s00018-006-6254-9. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6254-9>.
- Suchting, Steven, Freitas, Catarina, le Noble, Ferdinand, Benedito, Rui, Bréant, Christiane, Duarte, Antonio und Eichmann, Anne: The notch ligand delta-like 4 negatively regulates endothe-

- lial tip cell formation and vessel branching. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 104(9):S. 3225–3230, 2007. doi:10.1073/pnas.0611177104. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611177104>.
- Sun, L., Li, J. und Xiao, X.: Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral dna heterodimerization. In: *Nat Med*, Band 6(5):S. 599–602, 2000. doi:10.1038/75087. URL <http://dx.doi.org/10.1038/75087>.
- Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N. und Yancopoulos, G. D.: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. In: *Cell*, Band 87(7):S. 1171–1180, 1996.
- Szelid, Zsolt, Pokreisz, Peter, Liu, Xiaoshun, Vermeersch, Pieter, Marsboom, Glenn, Gillijns, Hilde, Pellens, Marijke, Verbeken, Erik, de Werf, Frans Van, Collen, Desire und Janssens, Stefan P: Cardiosselective nitric oxide synthase 3 gene transfer protects against myocardial reperfusion injury. In: *Basic Res Cardiol*, Band 105(2):S. 169–179, 2010. doi:10.1007/s00395-009-0077-4. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-009-0077-4>.
- Tuzun, Egemen, Oliveira, Eddie, Narin, Cuneyt, Khalil, Hassan, Jimenez-Quevedo, Pilar, Perin, Emerson und Silva, Guilherme: Correlation of ischemic area and coronary flow with ameroid size in a porcine model. In: *J Surg Res*, Band 164(1):S. 38–42, 2010. doi:10.1016/j.jss.2009.03.024. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2009.03.024>.
- Uren, N. G., Melin, J. A., Bruyne, B. De, Wijns, W., Baudhuin, T. und Camici, P. G.: Relation between myocardial blood flow and the severity of coronary-artery stenosis. In: *N Engl J Med*, Band 330(25):S. 1782–1788, 1994.
- Vajanto, Ismo, Rissanen, Tuomas T, Rutanen, Juha, Hiltunen, Mikko O, Tuomisto, Tiina T, Arve, Katja, Närvänen, Outi, Manninen, Hannu, Räsänen, Heikki, Hippeläinen, Mikko, Alhava, Esko und Ylä-Herttuala, Seppo: Evaluation of angiogenesis and side effects in ische-

- mic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding vegf and lacz. In: *J Gene Med*, Band 4(4):S. 371–380, 2002. doi:10.1002/jgm.287. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jgm.287>.
- van Royen, Niels, Piek, Jan J, Schaper, Wolfgang und Fulton, William F: A critical review of clinical arteriogenesis research. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 55(1):S. 17–25, 2009. doi:10.1016/j.jacc.2009.06.058. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.06.058>.
- Vatner, S. F.: Correlation between acute reductions in myocardial blood flow and function in conscious dogs. In: *Circ Res*, Band 47(2):S. 201–207, 1980.
- von Degenfeld, G., Giehl, W. und Boekstegers, P.: Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion. In: *Cardiovasc Res*, Band 35(2):S. 233–240, 1997.
- von Degenfeld, Georges, Banfi, Andrea, Springer, Matthew L, Wagner, Roger A, Jacobi, Johannes, Ozawa, Clare R, Merchant, Milton J, Cooke, John P und Blau, Helen M: Micro-environmental vegf distribution is critical for stable and functional vessel growth in ischemia. In: *FASEB J*, Band 20(14):S. 2657–2659, 2006. doi:10.1096/fj.06-6568fje. URL <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-6568fje>.
- von Degenfeld, Georges, Raake, Philip, Kupatt, Christian, Lebherz, Corinna, Hinkel, Rabea, Gildehaus, Franz Josef, Münzing, Wolfgang, Kranz, Andrea, Waltenberger, Johannes, Simoes, Marcus, Schwaiger, Markus, Thein, Eckart und Boekstegers, Peter: Selective pressure-regulated retroinfusion of fibroblast growth factor-2 into the coronary vein enhances regional myocardial blood flow and function in pigs with chronic myocardial ischemia. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 42(6):S. 1120–1128, 2003.
- Wang, L., Muramatsu, S., Lu, Y., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Urano, F., Ichinose, H., Nagatsu, T., Nakano, I. und Ozawa, K.: De-

- layed delivery of aav-gdnf prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of parkinson's disease. In: *Gene Ther*, Band 9(6):S. 381–389, 2002. doi: 10.1038/sj.gt.3301682. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301682>.
- Warrington, Kenneth H und Herzog, Roland W: Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. In: *Hum Genet*, Band 119(6):S. 571–603, 2006. doi: 10.1007/s00439-006-0165-6. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-006-0165-6>.
- Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R., Kotin, R. M. und Owens, R. A.: Adeno-associated virus (aav) rep proteins mediate complex formation between aav dna and its integration site in human dna. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 91(13):S. 5808–5812, 1994.
- White, F. C. und Bloor, C. M.: Coronary collateral circulation in the pig: correlation of collateral flow with coronary bed size. In: *Basic Res Cardiol*, Band 76(2):S. 189–196, 1981.
- WHO: Mortality and burden of disease. 2008. URL [http://www.who.int/entity/whosis/whostat/EN\\_WHS08\\_Table1\\_Mort.pdf](http://www.who.int/entity/whosis/whostat/EN_WHS08_Table1_Mort.pdf).
- Woods, Niels-Bjarne, Bottero, Virginie, Schmidt, Manfred, von Kalle, Christof und Verma, In-der M: Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. In: *Nature*, Band 440(7088):S. 1123, 2006. doi:10.1038/4401123a. URL <http://dx.doi.org/10.1038/4401123a>.
- Wu, Florence T H, Stefanini, Marianne O, Gabhann, Feilim Mac, Kontos, Christopher D, Annex, Brian H und Popel, Aleksander S: A systems biology perspective on svegfr1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. In: *J Cell Mol Med*, Band 14(3):S. 528–552, 2010. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00941.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00941.x>.
- Yan, Z., Zhang, Y., Duan, D. und Engelhardt, J. F.: Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 97(12):S. 6716–6721, 2000.

- Ylä-Herttuala, Seppo: An update on angiogenic gene therapy: vascular endothelial growth factor and other directions. In: *Curr Opin Mol Ther*, Band 8(4):S. 295–300, 2006.
- Ylä-Herttuala, Seppo und Alitalo, Kari: Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. In: *Nat Med*, Band 9(6):S. 694–701, 2003. doi:10.1038/nm0603-694. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nm0603-694>.
- Ylä-Herttuala, Seppo, Rissanen, Tuomas T, Vajanto, Ismo und Hartikainen, Juha: Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 49(10):S. 1015–1026, 2007. doi:10.1016/j.jacc.2006.09.053. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2006.09.053>.
- Zbinden, Stephan, Zbinden, Rainer, Meier, Pascal, Windecker, Stephan und Seiler, Christian: Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 46(9):S. 1636–1642, 2005. doi:10.1016/j.jacc.2005.01.068. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.01.068>.
- Ziada, A. M., Hudlicka, O., Tyler, K. R. und Wright, A. J.: The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. In: *Cardiovasc Res*, Band 18(12):S. 724–732, 1984.
- Zymek, Pawel, Bujak, Marcin, Chatila, Khaled, Cieslak, Anna, Thakker, Geeta, Entman, Mark L und Frangogiannis, Nikolaos G: The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. In: *J Am Coll Cardiol*, Band 48(11):S. 2315–2323, 2006. doi:10.1016/j.jacc.2006.07.060. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.060>.



# Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med. Christian Kupatt für die freundliche Überlassung des Themas und die wohlwollende Förderung meiner Dissertation danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. vet. Rabea Hinkel für ihre ausgezeichnete fachkundige Betreuung und hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit, für die wertvollen Literaturhinweise und ihre viele Geduld und Zeit, mit der sie mir während der Entstehung dieser Arbeit zur Seite stand.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, vor allem Dr. rer. nat. Chiraz El-Aouni, Dr. med. Jan Horstkotte, Tien Cuong Kieu, Susanne Helbig, Michael Thormann, Alexander Arnold und Georg Stachel, möchte ich für die freundschaftliche, wissenschaftliche und technische Unterstützung danken, ohne die die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl der uns die Räumlichkeiten des Walter Brendel Zentrums zur Durchführung unserer Experimente zur Verfügung stellte möchte ich danken. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. vet. Eckart Thein für die vielfache Unterstützung.

Meinen Eltern Siegmund und Antonina Wuchrer möchte ich für ihre verständnisvolle Unterstützung meines Studiums und dieser Arbeit danken.

Meinen Freunden Theresa Zeller, Carolin Fischer und Mirza Dedic möchte ich für ihre Hilfe und Ermutigung sowohl während des Studiums als auch darüber hinaus danken.